

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

**Significado de los anticuerpos anti-mica y anti-
endoteliales en la evolución del trasplante renal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Sánchez Zapardiel

Directora

Estela Paz Artal

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DPTO. MICROBIOLOGÍA I



SIGNIFICADO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-MICA Y
ANTI-ENDOTELIALES EN LA EVOLUCIÓN DEL
TRASPLANTE RENAL

Memoria para optar al grado de doctor presentada por

Elena Sánchez Zapardiel

Madrid, 2016



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I, área de Inmunología

Doctorado en Investigación Biomédica (RD 99/2011)

Título de la Tesis

Significado de los anticuerpos anti-MICA y anti-endoteliales en la evolución del trasplante renal

Tesis doctoral presentada por Elena Sánchez Zapardiel para optar al
grado de Doctor

Dirigida por la Doctora Estela Paz Artal

Doña ESTELA PAZ ARTAL, Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario 12 de Octubre.

CERTIFICA

Que el trabajo de investigación titulado **“Significado de los anticuerpos anti-MICA y anti-endoteliales en la evolución del trasplante renal”**, ha sido realizado por Doña Elena Sánchez Zapardiel, bajo mi dirección y asesoramiento, considerando que es apto para su defensa ante tribunal y reúne las condiciones exigibles para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, extendiendo el presente certificado en Madrid, 20 Septiembre 2016

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'E. Paz Artal', with a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo. Dra. Estela Paz Artal.



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I, área de Inmunología

Doctorado en Investigación Biomédica (RD 99/2011)

TESIS DOCTORAL

Significado de los anticuerpos anti-MICA y anti-endoteliales en la evolución del trasplante renal

Elena Sánchez Zapardiel

2016

A mis abuelos Irene, María, Pablo y Manuel

*“Probablemente de todos nuestros sentimientos
el único que no es verdaderamente nuestro es la esperanza.
La esperanza le pertenece a la vida, es la vida misma defendiéndose”
Rayuela – Julio Cortázar*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. Estela Paz Artal la oportunidad de realizar mi tesis doctoral bajo su dirección. Gracias por el apoyo y por transmitirme la constancia y la perseverancia, que han sido parte fundamental del aprendizaje. Gracias también a mi tutora M^a José Recio, por haberme ayudado durante esta etapa.

Mi más sincero agradecimiento a todo el Servicio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre: a la Dra. M^a José Castro, por su apoyo incondicional y porque siempre me hace sentir como en casa; al Dr. Pablo Morales, por las oportunidades recibidas y su inestimable ayuda; al Dr. Luis Allende, por el entusiasmo que transmite y la constante implicación con los residentes; al Dr. Antonio Serrano, por la oportunidad de participar en su línea de investigación y todo lo aprendido; a la Dra. Esther Mancebo, por su constante soporte e implicación en este trabajo; a la Dra. Pilar Varela, por haber sido la tutora inicial de esta tesis y por su valioso apoyo en los momentos más difíciles. Gracias igualmente a todos y cada uno de los técnicos: a José Antonio, Julián, Elena y especialmente a Carmen, con quienes coincidí durante mi primera rotación en HLA, porque lograsteis sacar palabras de la residente “poco habladora”, pero sobre todo sonrisas; a M^a Ángeles, Chus e Isabel, con quienes coincidí en Genética Molecular, gracias por vuestra sincera amistad y los buenos consejos recibidos; a los técnicos durante mi rotación en Inmunología Celular, Miguela, M^a José y Pepe, por el afecto con que me habéis tratado siempre y todo lo aprendido de vuestra mano; a Juncal, con quien no pude coincidir demasiado tiempo en Inmunoquímica, pero que igualmente me ha mostrado siempre su cariño, y a Carmen, por los tiempos difíciles en que coincidimos y por todo su apoyo en esa época, que ayudaron enormemente; por

último, a Marga y Pilar, las técnicas de Autoinmunidad durante mi rotación, por todo lo que he aprendido de vosotras y el afecto recibido. Gracias igualmente a Begoña y a Rosa, por estar siempre dispuestas a ayudar.

Como residente, he tenido la enorme suerte de coincidir con personas tan valiosas en lo profesional como en lo personal: gracias a Verónica, por transmitirnos siempre esa alegría; a Paloma, por su vitalidad contagiosa y su buen humor; a Diana, por todos los ánimos y los buenos consejos recibidos; a Sara, por recibir a sus R menores con tanto cariño y su lección de determinación y esfuerzo; a Marta, por su amistad, su motivación y ejemplo de constante superación; a Raquel, por su optimismo y su inestimable colaboración en este trabajo; a Sergio, por ofrecer continuamente la visión positiva de las cosas; a Fernando, por estar siempre tan dispuesto a colaborar con los demás; a Rocío, por saber transmitir su experiencia y por su enorme compañerismo; a Lola, por su sensibilidad y profesionalidad. Muy especialmente, quería expresar la suerte de haber sido co-residente de Ana, una persona trabajadora y tenaz, pero sobre todo una buena persona. Agradecerle todo su apoyo y colaboración en este trabajo, pero por encima de todo, su sincera amistad. Gracias también a Mauri, por todos los ánimos recibidos y el cariño.

Incluir en mis agradecimientos a aquellos residentes, anteriores o posteriores a mi periodo de residencia, que igualmente me han transmitido todo su apoyo: Óscar, Mou, Elena, Laura, Fran y Marcela; y a todo el personal de investigación y estudiantes que tuve la suerte de conocer durante esos años: Javi, Manu, José, Carolina y Alberto. Expresar especialmente mi gratitud a Sara, Lara, Lucía y María, por su enorme implicación en este estudio.

Agradecerles todo lo aprendido a los adjuntos, residentes y técnicos de laboratorio que conocí durante las rotaciones externas, especialmente a los/as coordinadoras de trasplante, por su valiosa colaboración en este trabajo. Gracias también a David Lora, del Servicio de Epidemiología, por las clases magistrales de estadística, y al Dr. José M^a Morales y la Dra. Jacqueline Apaza, del Servicio de Nefrología, por ofrecerme la oportunidad de colaborar con vosotros y vuestro constante apoyo.

De mi primera etapa en investigación, no podría estarle más agradecida a la Dra. M^a Teresa Portolés y la Dra. Raffaella Pagani por la oportunidad de trabajar en su grupo. Siempre recordaré ese tiempo con cariño y os agradeceré el trato exquisito que recibí y que sigo recibiendo por vuestra parte. Gracias también a M^a José, con quien he coincidido posteriormente y me ha mostrado siempre su afecto. Gracias a María, por haberme enseñado tantas cosas, y a Cecilia, por ser tan buena persona y amiga. Quería agradecerle especialmente a Conchi los tres años que pasé aprendiendo a su lado: gracias por tu paciencia, por transmitirme el entusiasmo de trabajar en lo que te gusta, por animarme y guiarme durante los últimos años de la carrera y por ser un ejemplo para mí. Gracias, sobre todo, por tu amistad, porque sigamos compartiendo vivencias y “cenas exóticas” en la ciudad que sea. Gracias también a André, por todos los ánimos recibidos.

Expresarle mi gratitud a Carmen Rúa por su sabiduría, su apoyo incondicional y las oportunidades recibidas durante los últimos años de la carrera.

De mi etapa actual, mi más sincero agradecimiento al Dr. Ricardo Pujol, por haber confiado en mí y haberme ofrecido la maravillosa posibilidad de seguir trabajando en lo que me gusta. Me he sentido tremendamente valorada y espero poder devolver con

buen trabajo todo el apoyo recibido. Agradecer a todo el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Vall d'Hebron su amable acogida, todas las oportunidades de crecimiento profesional y vuestros constantes ánimos en los últimos pasos de mi tesis.

Un especial agradecimiento al Prof. Stevens Sacks y al Dr. Richard Smith, del King's College de Londres, por concederme la posibilidad de realizar mi estancia doctoral dentro de su grupo de investigación. Agradecer especialmente a Toni, Roseanna, David, Dorota, Julia y Anna su sabiduría y paciencia.

Me gustaría reconocer el valioso apoyo de mis profesores de instituto, especialmente de Amalia, que marcó mi vocación por la Biología.

Como no podía ser de otra forma, querría expresar mi agradecimiento a amigos y familiares. Amistad y familia se llega a confundir con vosotros: Sandra, Giaco, Noé, Lucía, Eugenia y Estrella. Me hacéis sentir aceptada y querida tal como soy, así que con motivo o no de una tesis, os estaré siempre agradecida. A Sandra, por todos tus buenos consejos durante esta etapa, porque sabes escuchar, te preocupas por el resto, eres una persona entregada y sensible. A Giaco, porque eres una de las personas más honradas que he conocido y un gran amigo para todos; además, siempre estás atento de los posibles chistes malos que se puedan escapar al oído humano. A Noé, porque has sufrido de “oreja a distancia” todo el tiempo que ha llevado este trabajo de tesis y queda científicamente probado que eres el “amigo universal”, sin que podamos nunca ofrecerte ni la mitad a cambio. A Lucía, porque he tenido la enorme suerte de compartir piso contigo durante esta última etapa para confirmar lo que ya sabía: eres atenta, cariñosa y buena persona. A Eugenia, por la alegría, el optimismo y el buen humor que siempre transmites, porque eres detallista y sincera, siempre dispuesta a

ayudar a tus amigos. A Estrella (¡prima!), porque todo este tiempo he recibido tu apoyo y tus ánimos, porque eres una luchadora y el tiempo siempre pone las cosas en su sitio. Gracias igualmente a Juan y a Toni, porque siempre tenéis una palabra de ánimo.

Gracias a Naike, porque siempre has estado ahí, tu amistad es sincera, entregada y sé que puedo contar contigo.

Agradecer también a Laura, compañera de nueva ciudad de trabajo, por aguantarme durante esta última etapa, en la que me has animado y me has dado muy buenos consejos.

Por último, el más especial de los agradecimientos a toda mi familia. Sois y seréis lo más importante para mí. A mis padres, M^a Carmen y Manuel, por la absoluta entrega a sus hijos. Nos habéis dado la oportunidad que no tuvisteis y nos habéis dedicado siempre todo el cariño y la atención. Sois para nosotros un ejemplo de superación, trabajo y responsabilidad. A mis hermanos, Irene y José Manuel, porque puedo contar con vosotros en los buenos y en los malos momentos y es una alegría poder teneros a mi lado. A Antonio, por su buen humor y paciencia. A mi sobrina Helena, por traer un pan bajo el brazo y la felicidad a nuestra familia. A mis tíos y primos, por todo lo que hemos compartido y por seguir haciéndolo. A mis abuelos, porque a lo largo de vuestra vida habéis pasado por dificultades que no llegaremos a conocer gracias a vuestro esfuerzo y sacrificio. Un recuerdo muy especial a mi tío Vicente y a mi abuela María.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	9
SUMMARY	13
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	17
1. TRASPLANTE RENAL.....	19
1.1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	19
1.2. ETAPA PRE-TRASPLANTE	23
1.2.1. PRE-DIÁLISIS Y DIÁLISIS	23
1.2.2. LISTA DE ESPERA DE TRASPLANTE RENAL.....	24
1.3. EPIDEMIOLOGÍA DEL TRASPLANTE RENAL	27
1.4. ETAPA POST-TRASPLANTE	30
1.4.1. DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN	31
1.4.2. TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR.....	32
1.4.3. PATOLOGÍA DEL INJERTO RENAL.....	34
2. INMUNOLOGÍA DEL TRASPLANTE.....	37
2.1. RESPUESTA INMUNITARIA INNATA	38
2.1.1. COMPONENTE CELULAR DE LA INMUNIDAD INNATA	38
2.1.2. COMPONENTE SOLUBLE DE LA INMUNIDAD INNATA	39
2.2. RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA.....	40

2.2.1.	COMPONENTE CELULAR DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA	40
2.2.2.	COMPONENTE SOLUBLE DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA	42
2.3.	PAPEL DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A ANTÍGENOS HLA EN EL TRASPLANTE	43
2.3.1.	GENES Y ANTÍGENOS HLA	43
2.3.2.	ANTICUERPOS ANTI-HLA	43
2.3.3.	RECHAZO DEL INJERTO MEDIADO POR ANTICUERPOS ANTI-HLA	45
2.4.	PAPEL DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A ANTÍGENOS NO-HLA EN EL TRASPLANTE	46
2.4.1.	GENES Y ANTÍGENOS MICA	48
2.4.2.	ANTICUERPOS ANTI-MICA.....	53
2.4.3.	RECHAZO DEL INJERTO MEDIADO POR ANTICUERPOS ANTI-MICA..	55
2.4.4.	ANTICUERPOS FRENTE A CÉLULAS ENDOTELIALES	56
2.4.5.	RECHAZO DEL INJERTO MEDIADO POR AECA	58
3.	BIOMARCADORES PARA LA EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA EN EL PACIENTE TRASPLANTADO.....	60
3.1.1.	DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA Y NO HLA.....	61
3.1.2.	OTROS BIOMARCADORES	66
II.	OBJETIVOS GENERALES.....	69
III.	PUBLICACIONES	73
	CAPÍTULO 1	75

Harmful effect of preformed anti-MICA antibodies on renal allograft evolution in early posttransplantation period	75
OBJETIVOS	76
CONCLUSIONES	78
PUBLICACIÓN.....	79
CAPÍTULO 2	89
Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement dependent cytotoxicity.....	89
OBJETIVOS	90
CONCLUSIONES	92
PUBLICACIÓN.....	94
CAPÍTULO 3	107
Isolated <i>de novo</i> anti-endothelial cell antibodies and kidney transplant rejection .	107
OBJETIVOS	108
CONCLUSIONES	110
PUBLICACIÓN.....	111
IV. DISCUSIÓN GENERAL.....	123
V. CONCLUSIONES GENERALES	147
VI. BIBLIOGRAFÍA	153
VII. ANEXOS.....	183

ABREVIATURAS

A

Ab: Anticuerpo, 60

ADAM: Desintegrina y Metaloproteinasa, 50

ADCC: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos, 43

ADN: Ácido Desoxirribonucleico, 49

AECA: Anticuerpos Anti-Células Endoteliales, 53

Ag: Antígeno, 60

AGT: Angiotensinógeno, 45

AHG: Anti-Globulina Humana, 60

ALG: Globulina Anti-Linfocítica, 30

APC: Célula Presentadora de Antígeno Profesional, 38

ARHGEF6: Factor 6 de Intercambio de Nucleótido Guanina Rac/Cdc42, 45

AT1R: Receptor de Angiotensina II Tipo 1, 45, 53

ATG: Globulina Anti-Timocítica, 30

ATP: Nucleótido Adenina Trifosfato, 29

AZA: Azatioprina, 30

C

C': Complemento, 60

CCL21: Quimiocina CC Ligando 21, 54

CD: Cluster de Diferenciación, 30

CDC: Citotoxicidad Dependiente de Complemento, 56

CDS: Punteado Discreto Citoplasmático, 107

CE: Corticosteroides, 30

CKD5T: Pacientes Trasplantados en estadio 5 de la Enfermedad Renal Crónica, 132

CMV: Citomegalovirus, 26

CREG: Grupos de Reactividad Cruzada, 41

CRRY: Proteína Reguladora del Complemento, 36

CsA: Ciclosporina A, 30

CSNK2A2: Caseína Quinasa 2 Alfa 2, 54

CSP-ELISA: Enzimoinmunoensayo de captura de Proteínas sobre Superficies Celulares,
62

CXCL11: Quimiocina CXC Ligando 11, 45

CXCL9: Quimiocina CXC Ligando 9, 54

D

DAP10: Proteína Activadora DNAX-de 10kDa, 48

DC: Células Dendríticas, 35

DP: Diálisis Peritoneal, 20

DSA: Anticuerpos Donante Específicos, 42

Dte: Donante, 39

DTT: Ditiotreitól, 60

E

EC-XM: Pruebas Cruzadas con Células Endoteliales, 62

EDIL3: Repeticiones y Dominio Discoidina 3 similar al Factor de Crecimiento

Epidérmico, 54

EIF2A: Factor de iniciación de la Traducción Eucariota 2A, 45

ELISA: Enzimoimmunoensayo, 60

ELISPOT: Ensayo de Puntos por Inmunoabsorción ligado a Enzima, 63

EPCs: Células Endoteliales Precursoras, 62

ERA-EDTA: Asociación Renal Europea-Asociación de Diálisis y Trasplante Europea, 19

ErbB3-BP1: Proteína de Unión 1 a ErbB3, 45

ERC: Enfermedad Renal Crónica, 16

F

Fc: Fragmento c, 39

FC: Citometría de Flujo, 59

FcγR: Receptor del Fc de la IgG, 43

FLT3L: Tirosina quinasa 3 relacionada con Fms, 54

FUBP2: Proteína de Unión Corriente Arriba Lejana 2, 53

G

GDNF: Factor Neurotrófico Derivado de células Gliales, 45

GSTT1: Glutathión S-Transferasa Theta 1, 45

H

HD: Hemodiálisis, 20

HLA: Antígeno Leucocitario Humano, 23

Hsp: Proteína de Choque Térmico, 53

HUVEC: Células Endoteliales Humanas derivadas de Cordón Umbilical, 62

I

ICAM-4: Molécula de Adhesión Intercelular 4, 55

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta, 62

IFN- γ : Interferón gamma, 63

Ig: Inmunoglobulina, 60

IL: Interleuquina, 30

IRC: Insuficiencia Renal Crónica, 16

ITAC: Quimiocina Alfa atrayente de células T inducibles por Interferón, 45

IVIg: Inmunoglobulina Intravenosa, 31

K

KDIGO: Mejora de la Evolución Global de la Enfermedad Renal, 17

K-DOQI: Iniciativa de Calidad de la Evolución de la Enfermedad Renal, 17

KIR: Receptores tipo Inmunoglobulina de las células NK, 35

KRT1: Queratina-1, 45

L

LES: Lupus Eritematoso Sistémico, 22

M

mAb: Anticuerpo monoclonal, 30

MAC: Complejo de Ataque a la Membrana, 37

MCP-1: Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1, 57

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad, 35, 40

MICA: Cadena A relacionada con MHC de clase I, 35

MMF: Micofenolato de Mofetil, 30

mTOR: Mammalian Target Of Rapamycin, 30

N

NK: células Natural Killer, 35

NKG2D: Receptor del grupo 2D de las células Natural Killer, 35

O

OKT3: Muromonab CD3, 30

ONT: Organización Nacional de Trasplantes, 23

OR: Odds Ratio, 129

P

PDGFRA: Receptor Alfa del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas, 54

PDIA3: Proteína Precursora Disulfuro-Isomerasa A3, 53

PECR: Reductasa trans-2-Enoil-CoA Perioxosomal, 45

PF4: Factor Plaquetario 4, 54

PKC: Proteína Quinasa C, 45

PMNs: Leucocitos Polimorfonucleares, 29

PNC/NIC: Pielonefritis/Nefropatía Intersticial Crónica, 19

PSGL-1: Glicoproteína Ligando de P-selectina 1, 42

R

Rc: Receptor, 39

RFI: Retraso de la Función del Injerto, 27

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno, 29

S

sCD30: CD30 soluble, 63

SEN: Sociedad Española de Nefrología, 19

sMICA: MICA soluble, 50

SNPs: Polimorfismos de un Solo Nucleótido, 40

SPDYA: Miembro A de reguladores de ciclo celular Speedy/RINGO, 45

STMN3: Proteína de la familia Stathmin-like 3, 45

STR: Repeticiones Cortas en Tándem, 46

T

TAC: Tacrolimus, 30

TCR: Receptor de Célula T, 37

TFG: Tasa de Filtrado Glomerular, 16

Tg: Timoglobulina, 31

Tie2: Receptor de la Angiopoyetina 2, 62

TLR: Receptor Tipo Toll, 35

Tm: Transmembrana, 47

TNF: Factor de Necrosis Tumoral, 46

U

ULBP: Proteínas de Unión a UL16, 47

V

VCAM-1: Molécula de Adhesión Vascular 1, 57

VHB: Virus de la Hepatitis B, 26

VHC: Virus de la Hepatitis C, 26

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana, 22

Ψ

Ψ: Pseudogenes, 46

β

β2-GPI: Beta-2-Glicoproteína I, 54

RESUMEN

Significado de los anticuerpos anti-MICA y anti-endoteliales en la evolución del trasplante renal

Introducción. El trasplante renal es el principal tratamiento para los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC). Las respuestas inmunológicas generalmente se dirigen frente a dianas polimórficas, como el antígeno leucocitario humano (HLA). Las células endoteliales constituyen la primera barrera del trasplante. Estas células expresan un amplio rango de antígenos no-HLA de naturaleza polimórfica (por ejemplo, la cadena A relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I [MICA]) o no polimórfica (por ejemplo, vimentina), que pueden ser reconocidos por las células inmunológicas después de la reperusión, iniciando el desarrollo de respuestas alo- y auto-inmunes, respectivamente. Los anticuerpos anti-MICA y anti-endoteliales (AECA) tienen un impacto sobre la evolución del trasplante. Estos anticuerpos pueden mediar los procesos de rechazo o estar asociados con el daño endotelial y el deterioro crónico del injerto.

Objetivos. Nuestro objetivo es analizar el papel de los anticuerpos anti-MICA preformados y los AECA en la supervivencia del paciente y en la supervivencia, el rechazo y la función del injerto. También tenemos como objetivo describir de forma más extensa las especificidades anti-MICA y la localización de las dianas antigénicas endoteliales.

Resultados. Del total de la cohorte (n=727), 52 (7.15%) pacientes presentaron anticuerpos anti-MICA. Excluyendo aquellos individuos con anticuerpos anti-HLA, anti-

MICA y/o anti-receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R) (n=324), encontramos que 66 (20%) pacientes eran AECA-positivos (39 (12%) preformados [Pre+/Post+] y 27 (8%) *de novo* [Pre-/Post+]). La sensibilización pre-trasplante frente a dianas no-HLA no estaba relacionada con la inmunización anti-HLA, los trasplantes previos o el sexo femenino del receptor (embarazos potenciales).

Primero observamos que la supervivencia del trasplante era significativamente menor en pacientes con panel reactivo de anticuerpos (PRA) y anticuerpos anti-MICA pre-trasplante positivos (PRA+MICA+) en el periodo post-trasplante temprano (p=0.042). La tasa de rechazo (probado mediante biopsia) estaba aumentada después del mes 12 en el grupo PRA+MICA- y era mayor en el post-trasplante temprano en el grupo PRA+MICA+ (p=0.033). En el análisis multivariante, los receptores negativos para el ensayo multiplex de anticuerpos anti-HLA y positivos para anticuerpos anti-MICA (HLA-MICA+) mostraron el mayor riesgo de rechazo en el mes 3 (odds ratio [OR], 5.07; P=0.049), independientemente de otras variables.

Durante el seguimiento de 10 años, 14 (52%) pacientes AECA Pre-/Post+ experimentaron rechazo vs. 7 (18%) receptores AECA Pre+/Post+ y 57 (22%) AECA Pre-/Post- (OR 3.80, p=0.001). El estatus AECA Pre-/Post+ resultó ser un factor de riesgo independiente de rechazo del injerto, comparado con el grupo AECA Pre-/Post- (OR 5.17, p<0.001). Los episodios de rechazo del grupo con AECA *de novo* no eran predominantemente humorales o C4d+. Por otra parte, los pacientes AECA Pre-/Post+ y AECA Pre+/Post+ no mostraron mayor riesgo de muerte del paciente (OR 1.06 en AECA Pre-/Post+ y OR 1.49 en AECA Pre+/Post+; p=0.9 y p=0.7, respectivamente) o

pérdida del injerto (OR 0.86 en AECA Pre-/Post+ y OR 1.22 en AECA Pre+/Post+; $p=0.8$), comparado con la población AECA Pre-/Post-.

En cuanto a la función renal, los receptores PRA+MICA+ tardaron más tiempo en alcanzar niveles óptimos de creatinina en suero después del trasplante ($p=0.005$) y presentaron la menor tasa estimada de filtración glomerular en el mes 3 ($p=0.006$). El estatus PRA+MICA+ independientemente incrementó el riesgo del estadio 5 de la ERC en el mes 3 (hazard ratio [HR] 4.92, $p=0.030$). El retraso en la función del injerto y los niveles de creatinina en suero en la semana 1 eran significativamente mayores en los pacientes AECA *de novo* vs. preformados ($p=0.04$ and $p=0.03$, respectivamente).

Los anticuerpos anti-MICA preformados fueron poliespecíficos y mostraron reacciones más fuertes cuando coexistían con anticuerpos anti-HLA (intensidad de fluorescencia media $112,157 \pm 44,426$ en sueros HLA+MICA+ vs. $49,680 \pm 33,116$ en sueros HLA-MICA+, $p=0.0006$). Los anticuerpos anti-MICA eran específicos frente a dos supereplet principales (AYVE y CMGWS). La reactividad anti-AYVE era significativamente mayor en pacientes HLA+MICA+ vs. HLA-MICA+ ($p<0.001$) y significativamente superior frente al supereplet CMGWS en pacientes HLA+MICA+ ($p=0.001$). Tres sueros anti-MICA+ pre-trasplante de 13 resultaron positivos para el ensayo de unión de C1q; uno de ellos (suero 3) reconocía exclusivamente el supereplet AYVE con una fuerte reactividad frente al antígeno MICA*027 (similar a MICA*008, el alelo más frecuente en nuestra población). Los anticuerpos anti-MICA en el suero 3 (absorbido para eliminar anticuerpos anti-HLA) se unieron a moléculas MICA nativas en células MICA*008+ HeLa y blastos T estimulados con acetato de forbol miristato/CD28 y causaron la muerte celular mediante activación del complemento.

Encontramos seis patrones para AECA por inmunofluorescencia sobre células humanas de vena de cordón umbilical: anti-citoesqueleto, punteado discreto citoplasmático, anti-nuclear, similar a mitocondrial, *rod and rings* y anti-aparato de Golgi. En pacientes con AECA *de novo*, solamente se detectaron AECA anti-citoesqueleto o anti-nucleares y estos patrones se encontraban en todos los individuos que presentaban rechazos ($p=0.003$).

Conclusiones. La sensibilización frente a MICA y otros antígenos endoteliales es un evento independiente de la inmunización anti-HLA. Los anticuerpos anti-MICA preformados aumentan de forma independiente el riesgo de rechazo del trasplante renal y el efecto deletéreo del estatus PRA+ los primeros meses post-trasplante. Estos anticuerpos son poliespecíficos y pueden ser citotóxicos en algunas ocasiones, fijando y activando el complemento, de manera que contribuyen al deterioro temprano de la función del injerto renal. Los AECA *de novo* se asocian con el rechazo y sus dianas se localizan intracelularmente de forma mayoritaria. Los AECA pueden constituir un biomarcador útil de daño endotelial después del trasplante renal.

SUMMARY

Role of anti-MICA and anti-endothelial cell antibodies on kidney transplant evolution

Introduction. Kidney transplantation is the main treatment for patients with chronic kidney diseases (CKD). Immunological responses are usually directed against polymorphic targets, such as Human Leukocyte Antigens (HLA). Endothelial cells are the first barrier within the transplant. These cells express a wide range of either polymorphic (i.e. major histocompatibility complex class I-related chain A [MICA]) or non-polymorphic (i.e. vimentin) non-HLA antigens, that may be recognized by immune cells after reperfusion, triggering the development of allo- and auto-immune responses, respectively. Anti-MICA antibodies and anti-endothelial cell antibodies (AECA) impact on allograft evolution. These antibodies may cause antibody-mediated rejection or may be associated with endothelial injury and chronic deterioration of the graft.

Aim. We aimed to analyze the role of preformed anti-MICA antibodies and AECA on patient survival and kidney transplant survival, rejection and function. We also aimed to further describe anti-MICA specificities and location of endothelial targets.

Results. In the total cohort (n=727), 52 (7.15%) patients had preformed anti-MICA antibodies. Excluding patients with anti-HLA, anti-MICA and/or anti-angiotensin II type 1 receptor (AT1R) antibodies (n=324), we found that 66 (20%) patients were AECA-positive (39 (12%) preformed [Pre+/Post+] and 27 (8%) *de novo* [Pre-/Post+]). Pre-transplant sensitization against non-HLA targets was not related to anti-HLA

immunization, previous transplantations or recipient female sex (potential pregnancies).

We firstly observed that allograft survival was significantly decreased in patients with positive pre-transplant panel reactive antibody (PRA) and anti-MICA antibodies (PRA+MICA+) early after transplantation ($p=0.042$). Biopsy-proven allograft rejection rate increased after month 12 in PRA+MICA- group and was higher early after transplantation in PRA+MICA+ group ($p=0.033$). In the multivariate analysis, recipients negative for multiplex based assay-recorded anti-HLA antibodies and positive for anti-MICA antibodies (HLA-MICA+) showed the highest risk for rejection at month 3 (odds ratio [OR], 5.07; $P=0.049$), independently of other variables.

During a 10-year follow-up, 14 (52%) AECA Pre-/Post+ patients experience rejections vs. 7 (18%) AECA Pre+/Post+ and 57 (22%) AECA Pre-/Post- recipients (OR 3.80, $p=0.001$). AECA Pre-/Post+ status emerged as an independent risk factor for allograft rejection compared to AECA Pre-/Post- group (OR 5.17, $p<0.001$). Rejection in *de novo* AECA group was not predominantly humoral or C4d+. On the other hand, AECA Pre-/Post+ and AECA Pre+/Post+ patients did not show higher risk for either patient death (OR 1.06 in AECA Pre-/Post+ and OR 1.49 in AECA Pre+/Post+; $p=0.9$ and $p=0.7$, respectively) or allograft loss (OR 0.86 in AECA Pre-/Post+ and OR 1.22 in AECA Pre+/Post+; $p=0.8$) compared to AECA Pre-/Post- population.

Regarding renal function, PRA+MICA+ recipients exhibited longer time to reach optimal serum creatinine levels after transplantation ($p=0.005$) and had the lowest estimated graft filtration rate at month 3 ($p=0.006$). PRA+MICA+ status independently increased the risk for CKDT stage 5 at month 3 (hazard ratio [HR] 4.92, $p=0.030$).

Delayed graft function and creatinine serum levels at week 1 were significantly higher in *de novo* vs. preformed AECA patients ($p=0.04$ and $p=0.03$, respectively).

Pre-transplantation anti-MICA antibodies were polyspecific and showed stronger reactions when coexisting with anti-HLA antibodies (mean standard fluorescent intensity $112,157 \pm 44,426$ in HLA+MICA+ sera vs. $49,680 \pm 33,116$ in HLA-MICA+ sera, $p=0.0006$). Anti-MICA antibodies showed two main supereplet specificities (AYVE and CMGWS). Anti-AYVE supereplet reactivity was significantly higher in HLA+MICA+ vs. HLA-MICA+ patients ($p<0.001$) and significantly superior reactivity against CMGWS supereplet within HLA+MICA+ patients ($p=0.001$). Three of 13 anti-MICA+ pre-transplant sera were positive for the C1q binding assay; one of them (serum 3) exclusively recognized AYVE supereplet with a strong reactivity against MICA*027 antigen (same as MICA*008, the most frequent allele within our population). Anti-MICA antibodies in anti-HLA-absorbed serum 3 bound native MICA molecules in MICA*008+ HeLa cells and phorbol myristate acetate /CD28 stimulated T-blasts and mediated cell death by activating complement.

We recorded six different patterns for AECA by immunofluorescence on human umbilical vein endothelial cells: anti-cytoskeleton, cytoplasmic discrete speckles, anti-nuclear, mitochondrial-like, rod and rings and anti-Golgi apparatus. Within *de novo* AECA patients, only anti-cytoskeleton or anti-nuclear AECA were detected and appeared in all rejectors ($p=0.003$).

Conclusions. Pre-transplantation sensitization against MICA and other endothelial antigens is independent of anti-HLA immunization events. Preformed anti-MICA antibodies independently increase the risk for kidney transplant rejection and enhance

the deleterious effect of PRA+ status early after transplantation. These antibodies are polyspecific and may occasionally be cytotoxic by fixing and activating complement, contributing to worsen early kidney graft function. AECA *de novo* are associated with rejection and their targets are mainly located intracellularly. AECA may be useful as biomarkers for endothelial damage after renal transplantation.

I. INTRODUCCIÓN

GENERAL

1. TRASPLANTE RENAL

Una persona sana es portadora de dos riñones funcionantes en la región abdominal. Estos órganos son esenciales para la homeostasis del organismo ya que, aparte de su función excretora, también regulan el pH, el metabolismo intermediario de glucosa y aminoácidos, la presión sanguínea y el metabolismo fósforo-cálcico, y participan en la síntesis de eritropoyetina, implicada en la producción de eritrocitos en la médula ósea. El trasplante renal es la mejor opción terapéutica para aquellos individuos que padecen una insuficiencia renal crónica (IRC), la última etapa de la enfermedad renal crónica (ERC).

1.1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

La ERC supone un problema de salud que no sólo ve aumentada su prevalencia e incidencia sino que, frecuentemente, presenta complicaciones cardiovasculares asociadas, que complican el manejo del paciente (1). Diversas nefropatías pueden conducir a la ERC y en los casos de peor pronóstico a la IRC, cuyo único tratamiento es la diálisis y/o el trasplante renal (Figura 1).

La ERC se define como la presencia persistente, durante al menos tres meses, de alteraciones estructurales o funcionales del riñón (2). Los principales marcadores de lesión renal son el incremento de la proteinuria, el aumento del ratio albúmina/creatinina en orina, el sedimento urinario alterado, variaciones en marcadores bioquímicos en sangre y orina, así como hallazgos anormales en estudios de imagen. Por otra parte, la disfunción renal se refleja en una disminución de la tasa de filtrado glomerular (TFG), cuyo valor por debajo de $60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ equivale a

una pérdida de, aproximadamente, la mitad de la función y suele conducir, de forma más o menos rápida, a la IRC.

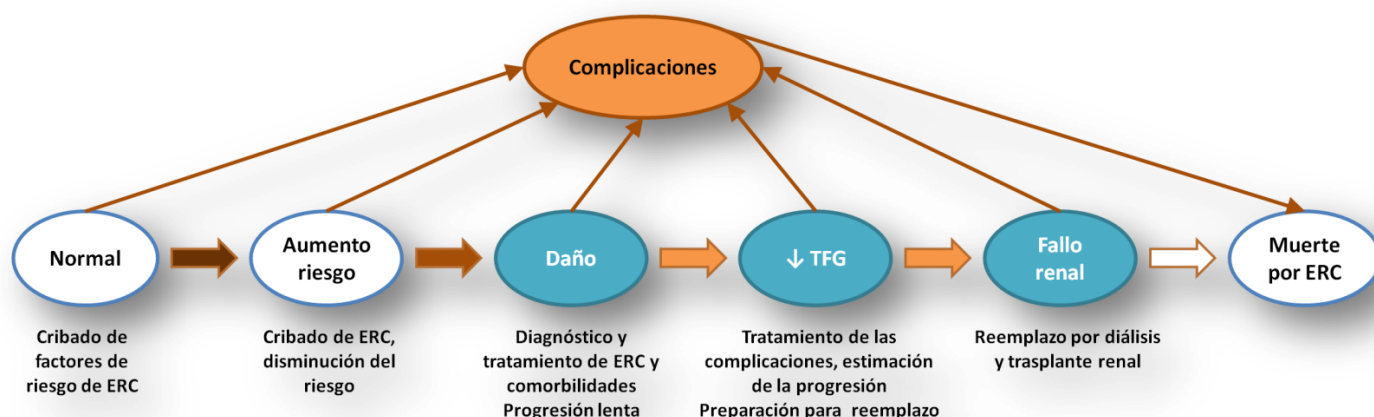


Figura 1. Esquema del inicio y progresión de la enfermedad crónica renal (ERC). Los círculos con relleno representan los diferentes estadios de la ERC. Los círculos sin relleno representan los posibles antecedentes o consecuencias de la ERC. Las flechas que conectan los círculos representan los factores de riesgo asociados con el inicio o progresión de la enfermedad: factores de susceptibilidad (ej. edad, historia familiar; flecha marrón oscuro), factores de inicio (ej. enfermedad de base, intoxicación por drogas; flecha marrón claro), factores de progresión (ej. presión arterial elevada, glucemia descontrolada; flecha naranja) y factores que conducen al estadio final (ej. anemia, acceso vascular temporal; flecha blanca). Las posibles intervenciones que se pueden realizar aparecen debajo de cada estadio de la ERC. Las complicaciones hacen referencia a todas aquellas derivadas de la enfermedad y su tratamiento (enfermedad cardiovascular, hipertensión, anemia, malnutrición, problemas óseos, neuropatía y descenso de la calidad de vida). TFG: Tasa de Filtrado Glomerular. [Adaptado de Levey et al. 2003 (1)].

Las guías K-DOQI (Iniciativa de Calidad de la Evolución de la Enfermedad Renal), elaboradas en 2002, permitieron la unificación de los criterios para la definición y clasificación de la ERC (2). Según este consenso, existen 5 estadios de ERC, cuyo pronóstico se basa en la reducción de la TFG (Tabla 1) y el nivel de albuminuria (Figura 2). En 2004 y 2006 el consorcio KDIGO (Mejora de la Evolución Global de la

Enfermedad Renal) actualizó estas guías, realizando algunas modificaciones. Entre otras, la consideración de los pacientes trasplantados como portadores de ERC y su inclusión en este mismo sistema de clasificación, agregando el sufijo “T” en cada estadio, para diferenciarlos de los individuos que no han recibido un trasplante.

Tabla 1. Estadios de la enfermedad renal crónica (ERC) según la tasa de filtrado glomerular (TFG).

[Adaptado de las guías K-DOQI, (2)].

ESTADIO	DESCRIPCIÓN	TFG (mL/min/1.73m ²)
1	Daño renal con TFG normal	≥ 90
2	Daño renal con ligero descenso de la TFG	60-89
3	Moderado descenso de la TFG	30-59
4	Severo descenso de la TFG	15-29
5	Insuficiencia renal	< 15 o diálisis

				Categorías albuminuria (mg/mmol)		
				A1	A2	A3
				Normal o ligeramente aumentada	Moderadamente aumentada	Severamente aumentada
				< 3	3-30	> 30
Categorías TFG (mL/min/1.73m ²)	G1	Normal o alta	≥ 90			
	G2	Ligeramente reducida	60-89			
	G3a	Ligera/moderadamente reducida	45-59			
	G3b	Moderada/severamente reducida	30-44			
	G4	Severamente reducida	15-29			
	G5	Fallo renal	< 15			

Figura 2. Pronóstico de riesgo de enfermedad renal crónica (ERC) en función de la tasa de filtrado glomerular (TFG) y la albuminuria. Los cuadros rellenos representan el riesgo de ERC como bajo (verde;

si no hay otros marcadores de enfermedad renal no se considera riesgo de ERC), moderadamente alto (amarillo), alto (naranja) y muy alto (rojo). [Adaptado de Stevens et al. 2013 (3)].

Las principales nefropatías de base que pueden conducir a la IRC aparecen resumidas en la Figura 3. Según datos de la Sociedad Española de Nefrología (SEN) obtenidos durante el año 2013 (4), la etiología más frecuente de enfermedad renal en individuos con edades entre 15-44 años es la hereditaria o congénita. En la franja de edad entre 45-64 años, la principal nefropatía es la enfermedad poliquística renal. Entre 65-74 años son más frecuentes los casos de diabetes mellitus, mientras que en mayores de 75 aumenta la incidencia de nefropatías vasculares.

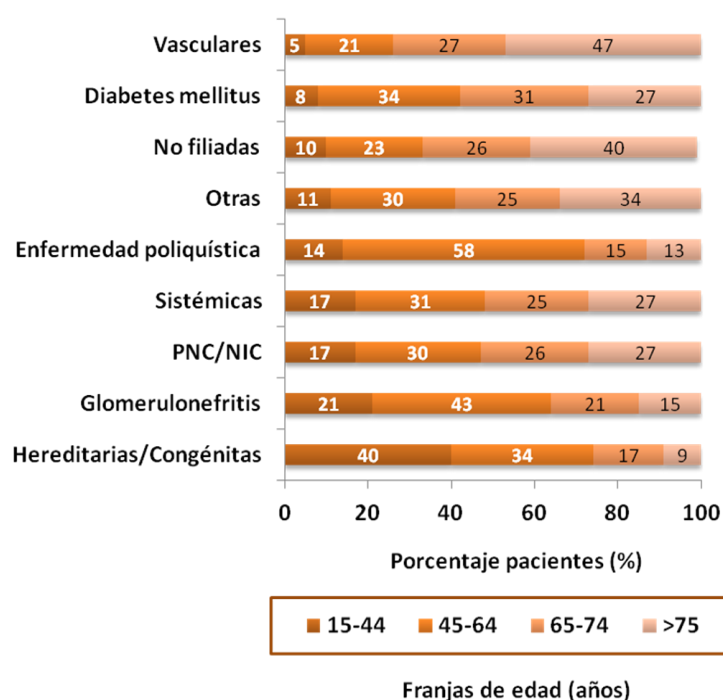


Figura 3. Causas de enfermedad renal primaria entre los pacientes que iniciaron diálisis en España en 2013, estratificados en función de la edad. Las enfermedades renales incluidas en cada grupo se encuentran codificadas según el registro de la *European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association* (ERA-EDTA) (5). PNC/NIC: pielonefritis/nefropatía intersticial crónica. [Datos recogidos en 2013 por la Sociedad Española de Nefrología (4)].

1.2. ETAPA PRE-TRASPLANTE

En la fase terminal de la ERC el paciente debe recibir tratamiento inmediato (6):

- **Tratamiento nutricional:** persigue asegurar una ingesta adecuada de alimentos para controlar la acidosis metabólica, las alteraciones hormonales o el aumento de citoquinas séricas.
- **Tratamiento conservador:** pretende enlentecer el deterioro progresivo mediante agentes anti-hipertensivos, que preservan la función renal.
- **Tratamiento sustitutivo:** diálisis y/o trasplante renal. Son terapias complementarias, pues la mayoría de los pacientes que reciben un injerto han pasado previamente por un periodo de diálisis (a excepción de los receptores de donantes vivos).

1.2.1. PRE-DIÁLISIS Y DIÁLISIS

La pre-diálisis se define como la situación clínica del paciente con IRC terminal que aún no ha iniciado el tratamiento sustitutivo. Los tratamientos nutricionales y conservadores durante esta etapa son determinantes (7).

La diálisis pretende sustituir al riñón no funcionante y prevenir o atenuar los síntomas urémicos derivados de la insuficiente depuración sanguínea. Existen dos modalidades diferentes: la hemodiálisis (HD) y la diálisis peritoneal (DP). La selección de un tipo u otro de tratamiento dependerá de factores médicos, sociales y geográficos.

En la HD una máquina conectada a través de un acceso vascular al torrente sanguíneo del paciente filtra los productos de desecho al líquido de diálisis y la sangre se devuelve “depurada” al individuo.

En la DP, la sangre se filtra a través de las membranas fisiológicas peritoneales del paciente, a las que se accede a través de un catéter. Se infunde una solución en la cavidad peritoneal y, tras un periodo de intercambio, se procede al drenaje de ese fluido. La DP potencia la autonomía del paciente y supone un ahorro en infraestructuras. Sin embargo, es necesaria la relación constante con una Unidad de Hemodiálisis, por la necesidad del paso transitorio o definitivo de DP a HD, o viceversa. El tratamiento por DP tiene una menor incidencia en España, donde el porcentaje de pacientes con IRC tratados varía entre el 5-24% (4). Aunque, por lo general, la DP se considera la forma menos artificial de filtrar los desechos del paciente con IRC, existe cierta controversia (8, 9).

1.2.2. LISTA DE ESPERA DE TRASPLANTE RENAL

Durante la etapa pre-trasplante, el paciente puede ser incluido en lista de espera de trasplante renal. Su monitorización durante esta fase será esencial para conocer la idoneidad del individuo como candidato a recibir un posible órgano.

En la Tabla 2 se recogen las indicaciones y contraindicaciones que deben considerarse antes de incluir a un paciente en lista de espera. La lista de contraindicaciones absolutas es menor que la de contraindicaciones relativas, debido al creciente éxito y los beneficios que aporta el trasplante, comparado con el resto de tratamientos.

Tabla 2. Indicaciones y contraindicaciones del trasplante renal. [Adaptado de Martín et al. 2006 (10)].

INDICACIONES	CONTRAINDICACIONES ABSOLUTAS*	CONTRAINDICACIONES RELATIVAS**
<ul style="list-style-type: none"> • Glomerulonefritis¹ • Pielonefritis • Enfermedades hereditarias² • Metabolopatías³ • Uropatía obstructiva • Nefropatía tóxica⁴ • Enfermedades sistémicas (LES) • Síndrome hemolítico-urémico • Tumores • Congénitas • Nefropatía aguda irreversible • Trauma 	<ul style="list-style-type: none"> • Cáncer reciente o metastásico • Infección activa aguda o crónica • Alto riesgo de no sobrevivir a la cirugía • Expectativa de vida <2 años • Enfermedad psiquiátrica grave, crónica y no controlable 	<ul style="list-style-type: none"> • Edad >75 años (edad biológica) • Cáncer previo no controlado • Malformación grave del tracto urinario • Drogadicción o alcoholismo • Incumplimiento terapéutico reiterado • Nefropatía activa clínica o serológica • Riesgo de recurrencia grave • Hepatitis B con replicación viral • Comorbilidad severa extra-renal • Coagulopatía severa • Retraso mental severo • Infección VIH complicada

LES: Lupus Eritematoso Sistémico; VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

* Las contraindicaciones absolutas son aquellas por las que no se realiza el trasplante

** Las contraindicaciones relativas desaconsejan el trasplante, pero se debe valorar en cada caso el riesgo que supone la realización o no de este procedimiento.

¹ Glomerulonefritis post-infecciosa, membranosa, membrano-proliferativa, nefropatía IgA, segmentaria y focal, síndrome de Goodpasture, púrpura de Schönlein-Henoch.

² Poliquistosis renal, síndrome de Alport, enfermedad quística medular.

³ Diabetes mellitus, hiperoxaluria, cistinosis, enfermedad de Fabry, amiloidosis, gota, etc.

⁴ Nefropatía por analgésicos, por opiáceos, etc.

Según la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) (11), durante los últimos años la lista de espera renal se ha mantenido bastante estable, con tendencia a disminuir a partir de 2009 (Figura 4).

En nuestro país la cifra de pacientes con IRC terminal en diálisis se sitúa en torno a 25.200 y más de 25.000 pacientes tiene un trasplante renal funcionando (11). Los pacientes que continúan en lista de espera renal suponen el 17,8% de individuos con IRC terminal, de los que un 6,9% son pacientes hiperinmunizados, con menor probabilidad de encontrar un donante compatible debido a que se encuentran sensibilizados frente a un elevado número de antígenos leucocitarios humanos (HLA).

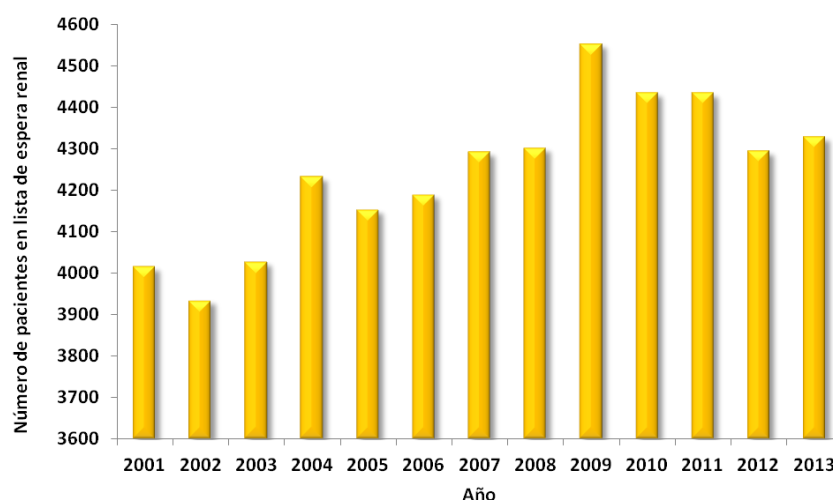


Figura 4. Evolución de la lista de espera de trasplante renal en España desde el año 2001 hasta el 2013. Tras el incremento paulatino del número de pacientes en espera de un trasplante renal durante la primera década de este siglo, este dato se estabiliza en los últimos cuatro años de los que se dispone registro. [Datos recogidos en 2013 por la Organización Nacional de Trasplantes (11)].

El estatus de un paciente incluido en la lista de espera puede variar en función de su estado de salud o de la decisión personal que tome sobre su tratamiento. Se pueden describir tres categorías diferentes: activa (normal o urgente), pasiva (no inclusión) y de contraindicación temporal (4). Cuando aparece un donante, se busca un posible receptor entre los pacientes activos en lista de espera, dando prioridad a los urgentes.

1.3. EPIDEMIOLOGÍA DEL TRASPLANTE RENAL

En España se realizan anualmente una media de 2.300 trasplantes renales (11). Durante 2013, se registraron 1.655 donantes de órganos sólidos. De ellos, 200 fueron donantes en los que ningún órgano pudo ser finalmente utilizado, lo que arroja una cifra de donación efectiva de 1.455 y una tasa de 30,9 donantes efectivos por millón de población.

TIPOS DE DONANTE

El 90% de los órganos proceden de donantes de muerte encefálica. En los últimos años, las donaciones que han experimentado un mayor incremento son las de vivo, aunque también se ha observado un aumento del donante en asistolia (Figura 5). La donación en asistolia es aquella en la que el fallecimiento del donante se diagnostica por criterios circulatorios y respiratorios (11).

Con respecto a las donaciones de vivo, la relación entre donante y receptor más frecuente es la conyugal (28%) y entre hermanos (22%). Su incremento en los últimos años se debe a los nuevos programas, que fomentan los trasplantes en cadena y cruzados. Los trasplantes cruzados aumentan las posibilidades de encontrar un donante de vivo, ya que participan dos parejas no relacionadas, de modo que los

receptores de cada una de ellas recibirán el órgano de forma cruzada con la otra pareja. El trasplante renal en cadena permite incrementar el número de pacientes que se benefician, al combinar la figura del donante altruista con el trasplante renal cruzado. Aunque toda donación es, por definición, voluntaria, altruista y desinteresada, se denomina donante altruista a aquella persona que dona un órgano a un desconocido que necesita un trasplante.

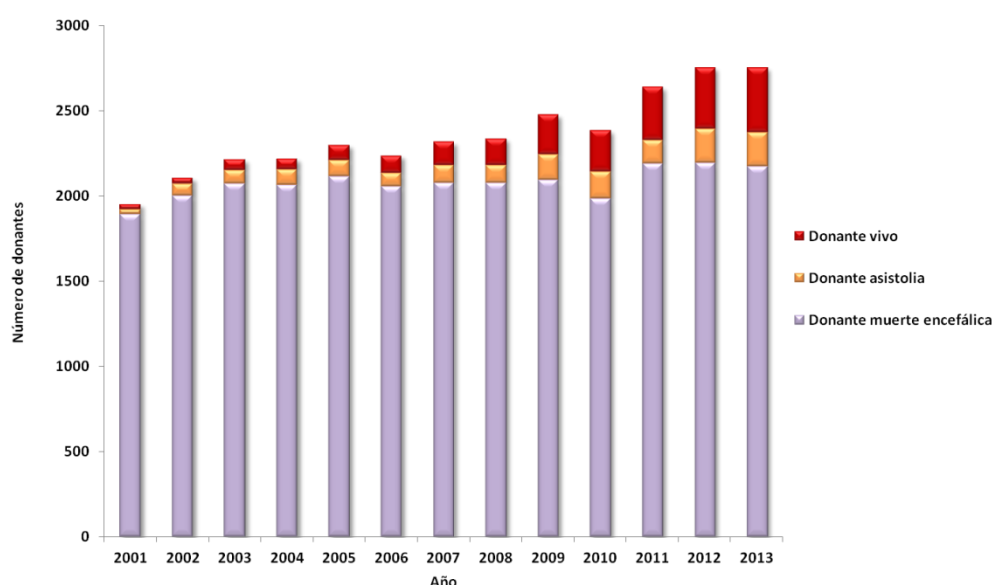


Figura 5. Evolución del número de donantes de muerte encefálica, en asistolia y vivos desde el año 2001 hasta el año 2013. El número de donantes cadáver sigue siendo superior al resto, pero cabe destacar que los donantes vivos son los que más han crecido en los últimos años. *[Datos recogidos en 2013 por la Organización Nacional de Trasplantes (11)].*

EDAD Y SEXO

La edad media de los donantes renales vivos es de $51,3 \pm 10,8$ años y la de los receptores de $43,5 \pm 16,0$ años (11). La edad mínima del receptor es de 2 años y la máxima de donantes y receptores de 76 años. La edad media de los donantes cadáver durante 2013 fue de $59,4 \pm 17,3$ años, notablemente mayor que la media hace dos

décadas. Dado que la edad de los donantes aumenta progresivamente en nuestro país, desde 1997 se realizan con éxito trasplantes birrenales en un mismo receptor también de edad avanzada, cuando el grado de glomeruloesclerosis o la edad del donante lo permiten.

Con respecto al sexo del donante y el receptor, el 62% de los donantes fueron mujeres y el 62% de los receptores fueron varones.

GRUPO SANGUÍNEO Y SEROLOGÍA

En cuanto al grupo sanguíneo, el 57% de los donantes son de grupo O frente a un 45% de receptores (11).

La serología positiva frente al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (VHB) en los donantes fue del 0%, frente al virus de la hepatitis C (VHC) del 1,5% y frente a citomegalovirus (CMV) del 83,1%. Aunque no se detectó infección por VHB, los anticuerpos frente al antígeno del *core* de la hepatitis B fueron positivos en el 12,3% de los donantes.

TIEMPO DE ISQUEMIA Y RE-TRASPLANTE

Tras la extracción de los riñones del donante, los órganos deben preservarse en una solución fría, para mantener la viabilidad celular.

El tiempo de isquemia caliente es el intervalo transcurrido entre el clampaje de los vasos renales y el enfriamiento del injerto con el líquido de preservación. Lo ideal es que ambas acciones se realicen al unísono. A veces, por problemas técnicos o una extracción tras parada cardíaca (donantes en asistolia) este tiempo se puede prolongar. No es recomendable utilizar riñones con isquemia caliente superior a los 60

minutos. A mayor periodo transcurrido, mayor será la incidencia del retraso en la función del injerto (RFI) (12).

Por otro lado, el tiempo desde que el órgano se encuentra en la solución de preservación hasta que se implanta en el receptor se conoce como tiempo de isquemia fría (varía desde minutos a horas, con una media de 13 horas). También es recomendable reducirlo en lo posible (13). Los avances técnicos han supuesto una mejora de los mecanismos de preservación, especialmente el uso de máquinas de perfusión, que permiten rescatar órganos límite por tiempos de isquemia prolongados (14, 15).

1.4. ETAPA POST-TRASPLANTE

Los valores para hacer un seguimiento de la función renal más empleados son la concentración de creatinina (en suero y orina), la proteinuria y la TFG. También se monitorizan otros parámetros bioquímicos, que nos dan idea del estado general del paciente trasplantado.

Durante la etapa post-trasplante pueden surgir diversas complicaciones, unas precoces y otras tardías (Tabla 3), que deben ser detectadas lo antes posible y tratadas adecuadamente, para evitar la pérdida del injerto.

Todas las variables epidemiológicas mencionadas en el apartado anterior influirán en el desarrollo de este tipo de complicaciones. Además, intervendrán otros factores, como el daño por isquemia-reperfusión o el tipo de tratamiento inmunosupresor.

Tabla 3. Complicaciones precoces y tardías del post-trasplante renal. [Adaptado de Martín et al. 2006 (10)].

COMPLICACIONES PRECOCES	COMPLICACIONES TARDÍAS
<ul style="list-style-type: none"> • Generales: dehiscencia herida, infección, rotura injerto renal, etc. • Necrosis tubular aguda • Vascular: sangrado, trombosis arterial o de la vena renal • Linfática: linfocele • Urológica: obstrucción, fístula urinaria • Rechazo: hiperagudo, acelerado, agudo • Nefrotoxicidad por anticalcineurínicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Estenosis de la arteria renal • Infecciones • Enfermedad cardiovascular: hipertensión arterial, coronariopatía, etc. • Nefropatía crónica del injerto • Recurrencia de la nefropatía de base • Tumores • Enfermedad ósea • Gastrointestinales, pancreáticas y hepáticas • Cutáneas • Hematológicas • Oculares • Neurológicas • Metabólicas: diabetes mellitus, aumento ácido úrico, etc.

1.4.1. DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

El posible daño por isquemia-reperfusión puede causar RFI y daño renal progresivo (Figura 6).

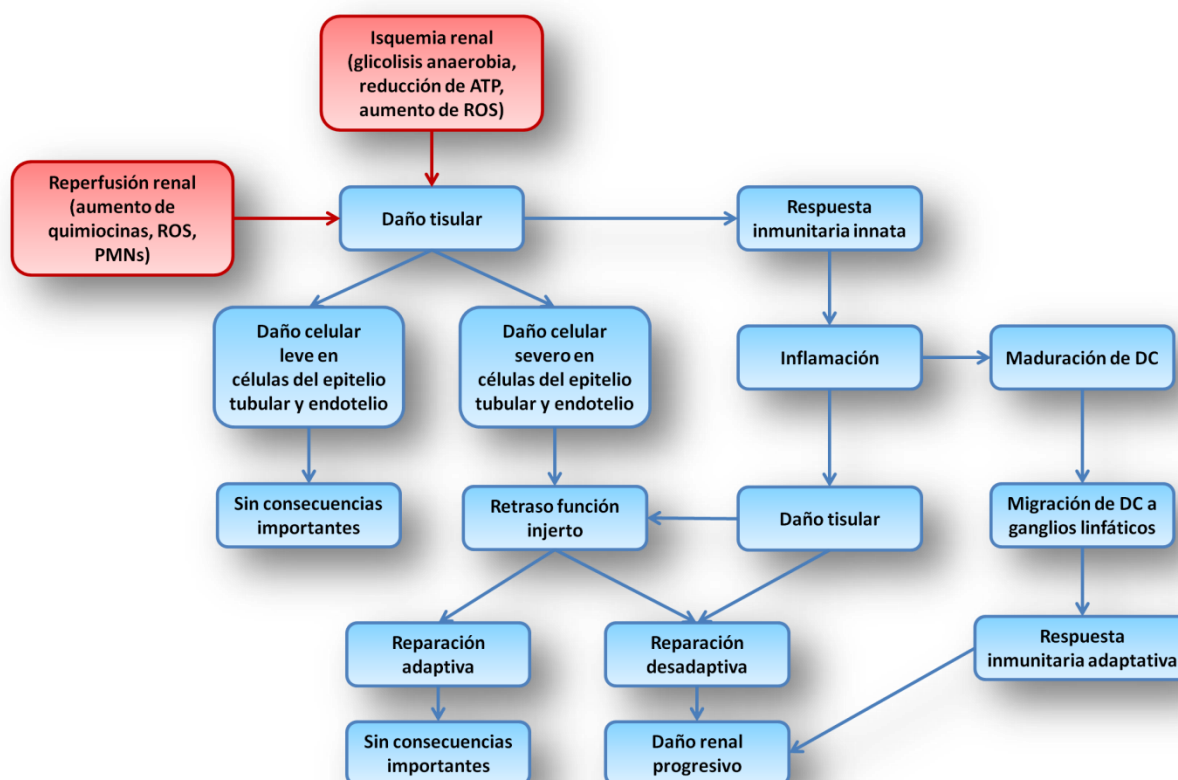


Figura 6. Esquema del daño por isquemia-reperfusión. Los dos rectángulos con relleno rojo representan el daño por isquemia y el daño por reperusión, respectivamente. Los rectángulos con relleno azul representan el resto de etapas de este fenómeno. ATP: nucleótido adenina trifosfato; DC: células dendríticas; PMNs: leucocitos polimorfonucleares; ROS: especies reactivas del oxígeno. [Adaptado de Ponticelli 2015 (12)].

El RFI se define como el fallo renal persistente que requiere diálisis en la primera semana después del trasplante renal y tiene implicaciones importantes en la evolución a largo plazo (16, 17). Los mecanismos implicados, tanto inmunológicos como no inmunológicos, contribuyen al deterioro progresivo de la función renal (18).

1.4.2. TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR

El tratamiento inmunosupresor se administra a los receptores renales antes de la cirugía y de manera crónica después del trasplante. Su objetivo es reducir la respuesta

inmunitaria frente al injerto. En cada fase se aconseja el empleo de un tipo de fármaco y unas dosis efectivas diferentes (6):

- **Terapia de inducción:** se administra antes o en el momento del trasplante. Se emplean antagonistas de la cadena alfa del receptor de la interleuquina (IL)-2 (clúster de diferenciación [CD]25), como el basiliximab o daclizumab. En pacientes hiperinmunizados se utilizan agentes deplecionantes de linfocitos, como anticuerpos policlonales anti-timocíticos (ATG) o anti-linfocíticos (ALG), aunque también pueden usarse anticuerpos monoclonales anti-CD3, como el muromonab-CD3 (OKT3).
- **Terapia de mantenimiento:** es el tratamiento crónico que se irá ajustando según la evolución del paciente, con tendencia a la reducción de las dosis. Se emplean inhibidores de la calcineurina, como tacrolimus (TAC) y ciclosporina A (CsA), o inhibidores de la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR), como sirolimus (rapamicina) y everolimus, y antiproliferativos, como mofetil (MMF) y azatioprina (AZA), combinados o no con corticosteroides (CE). En pacientes hiperinmunizados, se pueden combinar con rituximab, anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD20 deplecionante de linfocitos B.

Estos tratamientos se suelen combinar en terapias dobles (TAC + MMF), triples (TAC + MMF + CE) o cuádruples (TAC + MMF + CE + mAb). Además, existen otros fármacos que también pueden indicarse en algunos casos, como las proteínas de fusión que inhiben la coestimulación celular (belatacept), inhibidores del proteasoma (bortezomib) o inhibidores del complemento (eculizumab), así como plasmaféresis

para eliminar anticuerpos preformados, timoglobulina (Tg) o la inyección de inmunoglobulinas intravenosas (IVIg).

Si existen episodios de rechazo, el tratamiento se reajusta en función del resultado de la biopsia. Los rechazos celulares agudos se suelen tratar con OKT3 o CE, mientras que los rechazos mediados por anticuerpos se pueden tratar con CE, plasmaféresis, IVIg, rituximab o ALG. A largo plazo, se intenta reducir el uso de CE y convertir el tratamiento de inhibidores de calcineurina a inhibidores mTOR, debido a la nefrotoxicidad de los primeros.

Para que el tratamiento sea efectivo, es crucial mantener los niveles adecuados de fármacos en sangre, ya que se ha comprobado que la mayor parte de las pérdidas de función del injerto son consecuencia de la no adherencia al tratamiento por parte del receptor (19). También es importante que esos niveles no superen los óptimos, ya que aumentaría su toxicidad y el riesgo de infecciones (20) y cáncer (21).

Se ha observado que los polimorfismos del citocromo P450 3A4 influyen de forma importante en el metabolismo del TAC. Actualmente, se está estudiando si el análisis de estos polimorfismos en los receptores permite ajustar la dosis del inmunosupresor, y si ello mejora la eficacia de la terapia y reduce los costes del tratamiento (22).

1.4.3. PATOLOGÍA DEL INJERTO RENAL

La clasificación de Banff recoge los criterios anatomopatológicos para el diagnóstico de los rechazos agudos y crónicos. La versión más actualizada es de 2013 (23). En la Tabla 4 se resumen las categorías diagnósticas para biopsias de rechazo renal.

Tabla 4. Categorías de Banff para el diagnóstico de rechazo en las biopsias renales. [Adaptado de Haas et al. 2014 (23)].

1. Normal
2. Cambios mediados por anticuerpos (puede coincidir con las categorías 3, 4, 5 y 6)
Debida a anticuerpos donante específicos documentados y C4d o patología del injerto
<i>Deposición de C4d sin evidencia morfológica de rechazo activo</i>
C4d+ con ausencia de glomerulitis, capilaritis peritubular, vasculitis, microangiopatía trombótica o daño tubular agudo y sin rechazo agudo mediado por células T o cambios indeterminados
<i>Rechazo agudo/activo mediado por anticuerpos</i>
C4d+ o C4d- con inflamación moderada de la microvasculatura o aumento de la expresión de genes de daño endotelial, junto con presencia de anticuerpos donante-específicos circulantes y evidencia morfológica de daño agudo tisular
<i>Rechazo crónico activo mediado por anticuerpos</i>
C4d+ o C4d- con inflamación moderada de la microvasculatura o aumento de la expresión de genes de daño endotelial, junto con presencia de anticuerpos donante-específicos circulantes y evidencia morfológica de daño crónico tisular
3. Cambios borderline: sugerentes de rechazo agudo mediado por células T (puede coincidir con las categorías 2, 5 y 6)
Esta categoría se emplea cuando no hay arteritis intimal, pero hay focos de tubulitis (t1, t2 o t3) con infiltración intersticial menor (i0 o i1) o infiltración intersticial (i2, i3) con tubulitis débil (t1)

(Tabla 4 continúa en la siguiente página)

(Tabla 4 procede de la página anterior)

4. Rechazo mediado por células T (puede coincidir con las categorías 2, 5 y 6)

Rechazo agudo mediado por células T (tipo/grado)

- IA. Casos con infiltrado intersticial significativo (>25% del parénquima afectado, i2 o i3) y focos de tubulitis moderados (t2)
- IB. Casos con infiltrado intersticial significativo (>25% del parénquima afectado, i2 o i3) y focos de tubulitis severos (t3)
- IIA. Casos con arteritis intimal de leve a moderado (v1)
- IIB. Casos con arteritis intimal severa comprendiendo >25% del área luminal (v2)
- III. Casos con arteritis transmural y/o cambios arteriales fibrinoides y necrosis de las células musculares lisas mediales con acompañamiento de inflamación linfocítica (v3)

Rechazo crónico mediado por células T

Arteriopatía crónica del injerto (fibrosis arterial de la íntima con infiltrado mononuclear, formación de la neoíntima)

5. Fibrosis intersticial y atrofia tubular, sin evidencia de ninguna etiología (puede incluir esclerosis vascular o glomerular no específicas, pero la severidad se mide según las características tubulointersticiales)

Grados:

- I. Fibrosis intersticial leve y atrofia tubular (<25% del área cortical)
- II. Fibrosis intersticial moderada y atrofia tubular (26-60% del área cortical)
- III. Fibrosis intersticial severa y atrofia/pérdida tubular (>50% del área cortical)

6. Otros: Cambios que no se consideran debidos al rechazo – agudo y/o crónico; puede incluir glomerulitis, glomérulos de doble contorno o lesiones crónicas vasculares y coincidir con las categorías 2, 3, 4 y 5)

En algunos pacientes se produce un fenómeno de acomodación de forma que, aunque se detectan anticuerpos en suero, la inmunohistoquímica para C4d es negativa y el riñón trasplantado es funcionante. Se cree que este proceso ocurre a través de diversos mecanismos, como la internalización, la inhibición o la disminución de la expresión de los antígenos del donante, reduciendo de este modo la presencia de dianas potenciales para las respuestas inmunológicas (24, 25).

2. INMUNOLOGÍA DEL TRASPLANTE

La respuesta frente a antígenos extraños constituye la función principal del sistema inmunológico y, en condiciones normales, es la que permite proteger al individuo de posibles infecciones. Esa misma respuesta se suele desencadenar en los pacientes que reciben un órgano donado. Por ello, es importante que donante y receptor sean lo más parecidos posible genéticamente. Sólo se consigue evitar la alorespuesta en trasplantes entre gemelos monoigóticos, por lo que en el resto es crucial el tratamiento inmunosupresor post-trasplante.

En la alorespuesta frente al injerto pueden estar implicados mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa. Entre ambas existen nexos, que permiten su potenciación mutua. Se habla de rechazo celular si predomina este componente en la respuesta inmunitaria al aloinjerto, mientras que si predomina una respuesta de anticuerpos, hablamos de rechazo humoral. Ambos componentes están implicados, en mayor o menor medida, en toda alorespuesta.

2.1. RESPUESTA INMUNITARIA INNATA

2.1.1. COMPONENTE CELULAR DE LA INMUNIDAD INNATA

Los linfocitos *natural killer* (NK) y las células dendríticas (DC) son las principales células de la inmunidad innata implicadas en la respuesta al trasplante (26). Se cree que esta respuesta inicial promueve la adaptativa, aunque también se ha establecido un efecto tolerogénico (27, 28).

Los linfocitos NK detectan la disminución de HLA de clase I (ligando de los receptores inhibidores de NK, como los receptores tipo inmunoglobulina o KIR) y el aumento de moléculas de estrés celular (ligandos de los receptores activadores de NK, como el receptor del grupo 2D o NKG2D). Dado que la decisión de eliminar o no la célula diana también se toma en función de la densidad de ligandos para los receptores activadores (29), el daño por isquemia-reperfusión del injerto conduciría al aumento de la expresión de moléculas de estrés celular, entre las que destaca la proteína cadena A relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad o MHC de clase I (MICA).

Por su parte, las DC presentan en sus membranas receptores tipo Toll (TLR), que pueden identificar patrones moleculares asociados a daño celular, así como otros aloantígenos del injerto (30). La interacción de TLR con sus ligandos hace que la DC secrete distintos factores que conducen a su maduración y al desarrollo de respuestas adaptativas.

2.1.2. COMPONENTE SOLUBLE DE LA INMUNIDAD INNATA

Las vías alternativa y de las lectinas del complemento son el componente soluble fundamental de la inmunidad innata en respuesta al trasplante.

Se han identificado ficolinas y colectinas que reconocen residuos de manosa en las células tubulares activadas por el daño isquemia-reperfusión e inician la vía de las lectinas. La vía alternativa no presenta capacidad iniciadora a través de moléculas asociadas al daño tisular, pero puede amplificar el depósito de C3b, incrementando así la inflamación del injerto (31).

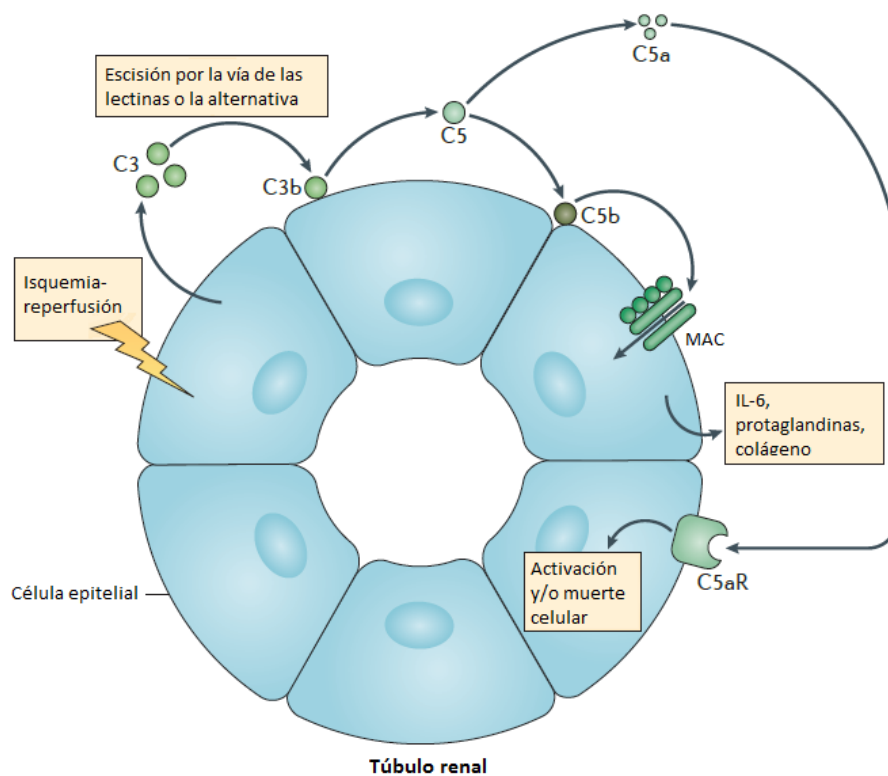


Figura 7. Modelo de la respuesta epitelial del túbulo renal al daño estrés celular. En modelos de ratón se ha demostrado que el daño por isquemia-reperfusión conduce a la pérdida del regulador del complemento CRRY y a la síntesis de C3 en el epitelio tubular. La vía de las lectinas inicia su escisión y la vía alternativa contribuye a aumentar los niveles de C3b. Los efectores de la vía lítica C5 y C5b-9 (complejo de ataque a la membrana o MAC) actúan sobre los túbulos. La liberación de C5a activa aún

más el epitelio al unirse a sus receptores (C5aR). Las células del túbulo secretan moléculas pro-inflamatorias, como la interleuquina (IL)-6 y prostaglandinas, además de productos pro-trombóticos, como el colágeno. *[Adaptado de Sacks & Zhou 2012 (31)]*.

Las proteínas C5a y C5b-9 del complejo de ataque a la membrana (MAC) de la vía lítica contribuyen a la apoptosis de las células del túbulo renal (24). Aunque el complemento es de síntesis fundamentalmente hepática, los niveles de C3 expresados por las células del injerto renal aumentan cuando se prolonga la isquemia fría, creando una activación local de las vías innatas del complemento (32). En la Figura 7 se representa un modelo murino de la respuesta del complemento al estrés celular.

Existe en este punto una conexión entre rechazo humoral y el celular, de modo que la síntesis local de C3 por parte del tejido trasplantado y las DC que presentan los antígenos regulará localmente la respuesta de las células T en el rechazo agudo (31, 33).

2.2. RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA

2.2.1. COMPONENTE CELULAR DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA

Los estudios en modelos animales de trasplante de piel, popularizados por Billingham y Medawar (34), llevaron a la conclusión de que los linfocitos T son los principales efectores del rechazo agudo.

La respuesta se produce tras la activación los receptores de células T (TCR), para lo cual necesitan que otra célula procese y les presente el antígeno sobre una molécula HLA. Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ reconocen péptidos presentados por HLA clase I, que se expresa en todas las células nucleadas, mientras que a los linfocitos T *helper*

CD4+ les presentan péptidos las células profesionales presentadoras de antígeno (APC), que expresan HLA de clase II.

En un receptor renal, sus células T reconocerán aloantígenos del donante a través de tres vías diferentes, descritas en la Figura 8.

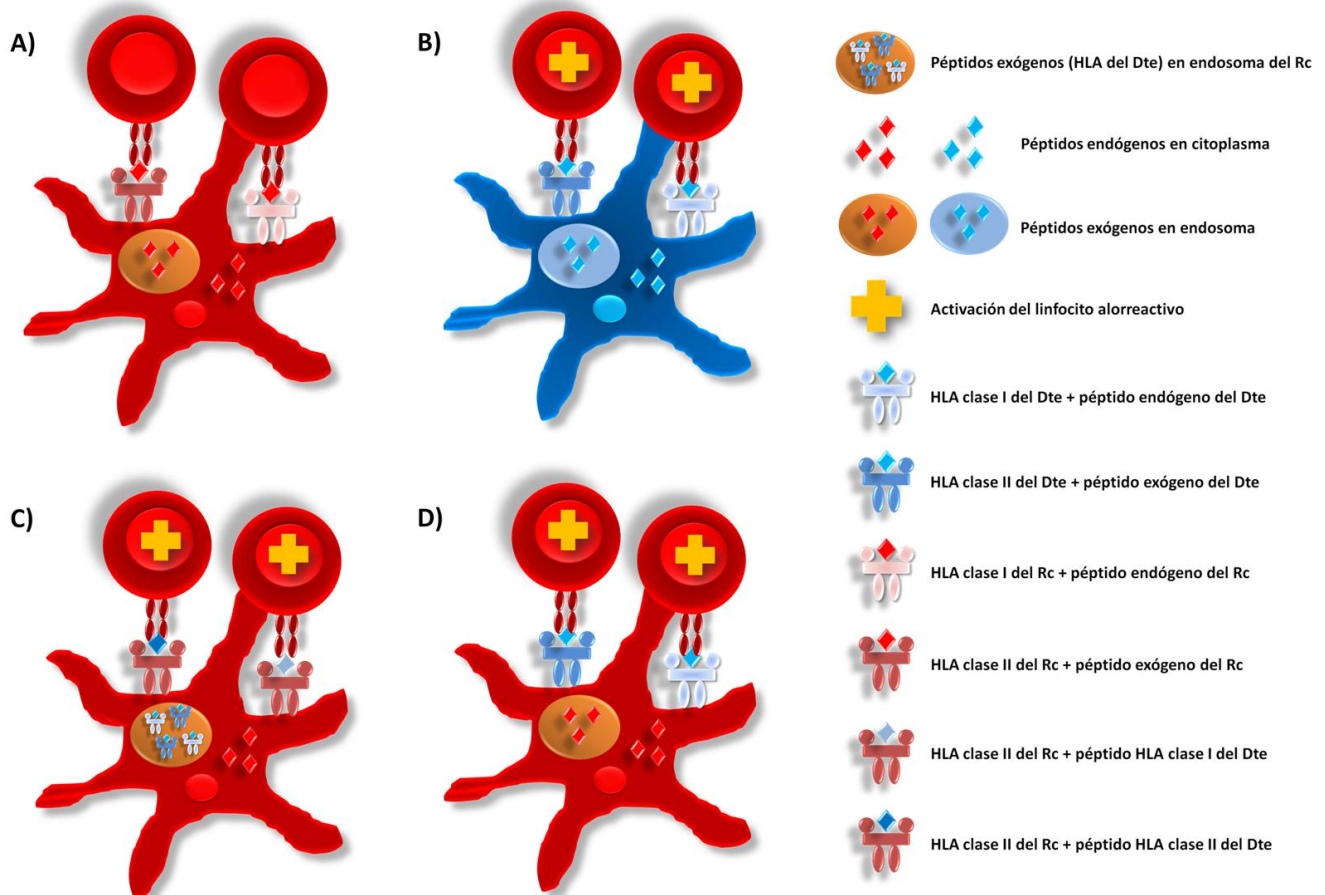


Figura 8. Esquema de las vías de presentación antigénica en los receptores de un trasplante renal.

Antes del trasplante, las células presentadoras de antígeno (APC) del receptor (rojo) unen péptidos endógenos (citoplasma) y exógenos (endosomas) a través de HLA de clase I y II propio, respectivamente, y los presentan a sus linfocitos T, sin que se produzca su activación (A). Después del trasplante, la activación de los linfocitos T alorreactivos puede darse a través de tres vías: la vía directa (B), en la cual las células que estaban en el injerto (azul) pueden ser reconocidas por los linfocitos T del receptor; la vía indirecta (C), en la que las propias APC del receptor captan y procesan moléculas de HLA del donante y las presentan a los linfocitos T del receptor como péptidos en HLA de clase II propias; y la vía semidirecta (D), en la que las APC del receptor captan y procesan moléculas de HLA del donante y las presentan a los linfocitos T del receptor como péptidos en HLA de clase II propias.

(D), en las que las APC del receptor captan las moléculas HLA del donante (endosomas), por contacto célula-célula o a través de exosomas, y son reconocidas como extrañas por los linfocitos T alorreactivos del receptor. Dte: Donante; Rc: Receptor.

2.2.2. COMPONENTE SOLUBLE DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA

En 1938, Gorer fue el primero en demostrar que los aloantígenos provocan el desarrollo de anticuerpos (35). El rechazo agudo mediado por anticuerpos se produce principalmente por activación de la vía clásica del complemento (25, 36) y tiene un importante efecto en la supervivencia del trasplante (37, 38). Alrededor del 5-7% de los rechazos agudos renales está mediado por anticuerpos, mientras que en individuos presensibilizados suponen el 20-48% de los episodios (36, 39).

La vía clásica del complemento supone el puente entre la inmunidad innata y la adaptativa, ya que para activarse necesita la interacción con la región constante de las cadenas pesadas (Fc) de las inmunoglobulinas o anticuerpos citotóxicos de isotipo IgG (subclases IgG1 e IgG3, principalmente) o IgM, producidos por las células plasmáticas. Sin embargo, las lesiones que provocan el deterioro crónico del injerto no dependen de la activación del complemento (40, 41), sino de los anticuerpos que se unen a receptores de células de la inmunidad innata (42).

La teoría humoral del trasplante, establecida por Terasaki *et al.*, resalta el papel de los anticuerpos anti-HLA, aunque también muestra la relevancia de otras especificidades no-HLA (43, 44).

2.3. PAPEL DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A ANTÍGENOS HLA EN EL TRASPLANTE

2.3.1. GENES Y ANTÍGENOS HLA

Los antígenos HLA están codificados por genes altamente polimórficos localizados en el brazo corto del cromosoma 6, dentro del complejo mayor de histocompatibilidad o MHC (6p21.1-21.3). Esta región cromosómica (4Mb) en humanos codifica los seis genes HLA clásicos relacionados con el trasplante: HLA-A, HLA-B, HLA-Cw (genes de clase I) y HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP (genes de clase II). Se ha confirmado que el gen HLA-B es el más polimórfico del genoma humano, sobre todo por cambios de una sola base (SNPs) (45).

Los genes clásicos HLA de clase I se traducen en una proteína de membrana con tres dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), que se asocian de forma no covalente al polipéptido $\beta 2$ -microglobulina. Las proteínas HLA de clase II clásicas son heterodímeros formados por una cadena pesada α y una ligera β , cada una de ellas con dos dominios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$, $\beta 2$, respectivamente).

En cada individuo, las proteínas HLA están codificadas por seis alelos diferentes con expresión codominante, por lo que lo más probable es que siempre exista algún grado de incompatibilidad HLA.

2.3.2. ANTICUERPOS ANTI-HLA

Los anticuerpos anti-HLA pueden aparecer como consecuencia de la inmunización del paciente por un trasplante previo o por contacto con sangre de un individuo

genéticamente distinto tras recibir una transfusión o durante el embarazo y/o parto. La frecuencia de los anticuerpos anti-HLA en pacientes trasplantados es variable. El porcentaje de sensibilización pre-trasplante se sitúa en torno al 18,7-32% (38, 41). Post-trasplante, un 20-30% de receptores desarrolla estos anticuerpos (46), aunque se ha descrito un rango más variable (2-60%), según la técnica empleada para su detección (47).

El reconocimiento de epítomos específicos desencadena la respuesta humoral adaptativa. En 2002, Ducquesnoy (48) describió el algoritmo del HLAMatchmaker (49), basado en los triplete o secuencias lineales de tres residuos de aminoácidos en las regiones extracelulares de la molécula HLA. Posteriormente, según la contribución de residuos de aminoácidos críticos en el establecimiento de la unión antígeno-anticuerpo, se diferenciaron los epítomos lineales (tripletes) y conformacionales (eplets) (50). Tanto los triplete como los eplets pueden ser monomórficos o polimórficos (51). Por otra parte, se establecen las diferencias entre los epítomos privados (específicos de un antígeno) y los públicos (compartidos por más de un antígeno HLA), dando lugar estos últimos a los grupos de reactividad cruzada (CREG).

Claas y colaboradores (52) destacan que pueden existir algunos aloantígenos HLA más inmunogénicos que otros, lo que da origen al concepto de la compatibilidad funcional, versus la compatibilidad estructural, que sería aquella que busca la expresión de los mismos antígenos del receptor en las células del donante. La compatibilidad funcional existe entre proteínas que forman parte del mismo CREG y que, por lo tanto, podrían resultar menos inmunogénicas. Esto da lugar a lo que se conoce como incompatibilidades “aceptables” para el trasplante. Las diferencias

basadas en los epítomos van cobrando más importancia que las basadas en la molécula completa, por lo que se ha creado una base de datos con los residuos polimórficos descritos hasta la fecha, tanto para antígenos HLA como no-HLA (53).

2.3.3. RECHAZO DEL INJERTO MEDIADO POR ANTICUERPOS ANTI-HLA

La presencia de anticuerpos donante específicos (DSA) frente a antígenos HLA constituye un criterio para el diagnóstico del rechazo agudo/activo mediado por anticuerpos (Tabla 4) (23), ya que presentan un gran impacto en la evolución del trasplante renal (54, 55). Sin embargo, pueden detectarse DSA en un paciente trasplantado sin que existan evidencias histológicas o moleculares de daño mediado por anticuerpos (acomodación), lo que demuestra que su sola presencia no supone un detrimento inmediato en la función del injerto, aunque su persistencia podría asociarse con el desarrollo de rechazo crónico (41). Asimismo, los DSA pueden dejar de detectarse en el suero durante los episodios de rechazo, probablemente porque quedan absorbidos en el injerto, donde estarían participando en la alorrespuesta (56). También se han descrito otros anticuerpos no-DSA en trasplantes entre hermanos HLA-idénticos (57) y en cohortes no emparentadas (58), que se correlacionaron con una peor evolución del injerto.

El principal efecto de los anticuerpos anti-HLA es la activación de la vía clásica del complemento. Sin embargo, estos anticuerpos pueden iniciar la alorrespuesta a través de otros mecanismos (59). Su unión a la vasculatura activa las células endoteliales, incrementando los niveles de la glicoproteína ligando de P-selectina 1, que atrae sobre todo a monocitos. También aumenta la expresión de HLA de clase II y, consecuentemente, la inmunogenicidad de las células endoteliales. Las anafilotoxinas

C3a y C5a atraen distintos tipos de leucocitos. Además, los monocitos, neutrófilos y células NK expresan en sus membranas receptores de IgG (FcγR) y median los procesos de fagocitosis y de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC).

2.4. PAPEL DE LOS ANTICUERPOS FRENTE A ANTÍGENOS NO-HLA EN EL TRASPLANTE

Cada vez se conoce un mayor número de anticuerpos frente a antígenos no-HLA relacionados con la peor evolución del trasplante renal (Tabla 5).

Tabla 5. Recopilación de los principales antígenos no-HLA implicados en la evolución del trasplante renal.

ANTÍGENO NO-HLA	AUTORES DEL ESTUDIO	Nº PACIENTES	REFERENCIA
Agrina	Joosten <i>et al.</i> 2005	16	(60)
AGT	Li <i>et al.</i> 2010	65	(61)
Alfa-tubulina	Qin <i>et al.</i> 2013	39	(62)
ARHGEF6	Li <i>et al.</i> 2009	18	(63)
AT1R	Dragun <i>et al.</i> 2005	33	(64)
	Giral <i>et al.</i> 2013	600	(65)
Colágeno IV	Dehan <i>et al.</i> 1996	1	(66)
Duffy	Lerut <i>et al.</i> 2007	370	(67)
EIF2A	Qin <i>et al.</i> 2013	39	(62)
Endotelial	Breimer <i>et al.</i> 2009	147	(68)
	Jackson <i>et al.</i> 2011	60	(69)
	Sun <i>et al.</i> 2011	226	(70)

(Tabla 5 continúa en la siguiente página)

(Tabla 5 procede de la página anterior)

ANTÍGENO NO HLA	AUTORES DEL ESTUDIO	Nº PACIENTES	REFERENCIA
ErbB3-BP1	Qin <i>et al.</i> 2013	39	(62)
Fragmento LG3 del perlecano	Soulez <i>et al.</i> 2012	16	(71)
	Cardinal <i>et al.</i> 2013	15	(72)
GNDF	Sigdel <i>et al.</i> 2013	98	(73)
GSTT1	Aguilera <i>et al.</i> 2008	4	(74)
	Álvarez-Márquez <i>et al.</i> 2009	19	(75)
IFNγ	Sigdel <i>et al.</i> 2013	98	(73)
ITAC (CXCL11)	Sigdel <i>et al.</i> 2013	98	(73)
Kidd	Lerut <i>et al.</i> 2007	370	(67)
KRT1	Qin <i>et al.</i> 2013	39	(62)
MICA/B	Zwirner <i>et al.</i> 2000	73	(76)
	Sumitran-Holgersson <i>et al.</i> 2002	139	(77)
	Zou <i>et al.</i> 2007	1910	(78)
	Li <i>et al.</i> 2010	15	(79)
	Narayan <i>et al.</i> 2011	1	(80)
	Chaudhuri <i>et al.</i> 2013	124	(81)
MIG (CXCL9)	Sigdel <i>et al.</i> 2013	98	(73)
PECR	Dinavahi <i>et al.</i> 2011	39	(82)
PKCζ	Sutherland <i>et al.</i> 2009	15	(83)
SPDYA	Li <i>et al.</i> 2010	65	(61)
STMN3	Li <i>et al.</i> 2009	18	(63)
Vimentina	Carter <i>et al.</i> 2005	48	(84)

AGT: angiotensinógeno; ARHGEF6: Factor 6 de intercambio de nucleótido guanina Rac/Cdc42; AT1R: receptor de angiotensina II tipo 1; CXCL11: quimiocina CXC ligando 11; EIF2A: factor de iniciación de la traducción eucariota 2A; ErbB3-BP1: Proteína de unión 1 a ErbB3; GDNF: factor neurotrófico derivado de células gliales; GSTT1: glutatión S-transferasa theta 1; IFN γ : interferón gamma; ITAC: Quimiocina alfa atrayente de células T inducibles por interferón; KRT1: queratina-1; MICA: cadena A relacionada con MHC de clase I; PECR: reductasa trans-2-enoil-CoA perioxosomal; PKC: proteín-quinasa C; SPDYA: miembro A de reguladores del ciclo celular speedy/RINGO; STMN3: proteína de la familia Stathmin-like 3

Los antígenos polimórficos, como queratina-1 (KRT1), glutatión-S transferasa theta 1 (GSTT1) o MICA (85), pueden dar lugar a alorrespuestas similares a las descritas para HLA. Sin embargo, la presencia de anticuerpos frente a antígenos monomórficos se podría deber al desarrollo de respuestas autoinmunitarias por pérdida de la tolerancia o exposición a antígenos crípticos (86).

2.4.1. GENES Y ANTÍGENOS MICA

En 1994, dos grupos independientes describieron por primera vez el locus MIC (87, 88). Esta familia de genes se localiza en el sistema MHC del cromosoma 6 (6p21.1-21.3), dentro del grupo de genes MHC de clase I. Tiene un total de 7 componentes: MICA-G. De todos ellos, sólo MICA y MICB codifican para proteína. La cercanía entre el locus MICA y HLA-B hace que estén en desequilibrio de ligamiento (Figura 9), siendo los haplotipos MICA*008-B*08:01, MICA*027-B*40:02 y MICA*002:01-B*40:35 los más frecuentes (89).

El gen MICA comprende 11Kb y se sitúa a 46Kb del centrómero (Figura 9) y contiene 6 exones, separados por 5 intrones (90). Actualmente, se han descrito un total de 102 alelos MICA (91). Los polimorfismos de este gen se localizan en los exones 2-5. Las diferencias en los exones 2-4 consisten en cambios de aminoácido en los dominios

extracelulares. En esta región se encuentra el mayor grado de polimorfismo (89). Los polimorfismos del exón 5 se deben al número de repeticiones cortas en tándem (STR, microsatélite) del trinucleótido CGT, que codifica para 4-10 alaninas en el dominio transmembrana (92). Además, se han descrito otros polimorfismos en la región 5' promotora (P1-11), que podrían marcar ciertas diferencias en la expresión entre individuos que presentan el mismo alelo (93).

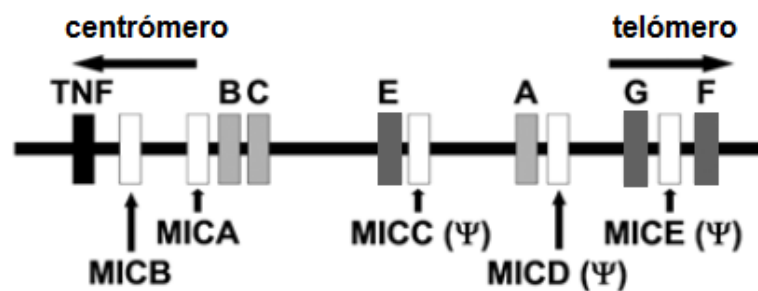


Figura 9. Mapa esquemático de la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I donde se localizan los genes cadena A relacionada con MHC de clase I (MIC). Aparecen representados los genes MHC de clase I clásicos (cajas gris claras), los genes MHC de clase I no clásicos (cajas gris oscuras), los genes MICA (cajas blancas) y el gen del factor de necrosis tumoral (TNF) aparece (caja negra). Ψ: pseudogenes. [Adaptado de Zwirner et al. 2006 (94)].

Pese a su elevado polimorfismo, existe en la población un número reducido de alelos MICA más frecuentes. MICA*008 es el alelo más frecuente en la población caucásica, por encima del 50%, seguido de MICA*002, *004, *001, *009, *016 y *010 (95-97).

El producto final del locus MICA es una glicoproteína de superficie de 383 aminoácidos con estructura similar al HLA de clase I, ya que presenta una región extracelular dividida en tres dominios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), una región transmembrana y una cola citoplasmática (Figura 10A). De su cristalización se observó que el alfa-hélice del

dominio $\alpha 2$ se encuentra desordenado y es flexible (Figura 10B), impidiendo la unión de péptidos a la hendidura. Además, aunque MICA se relaciona con HLA de clase I, la homología de secuencia entre ambas es reducida (15-36%) (89).

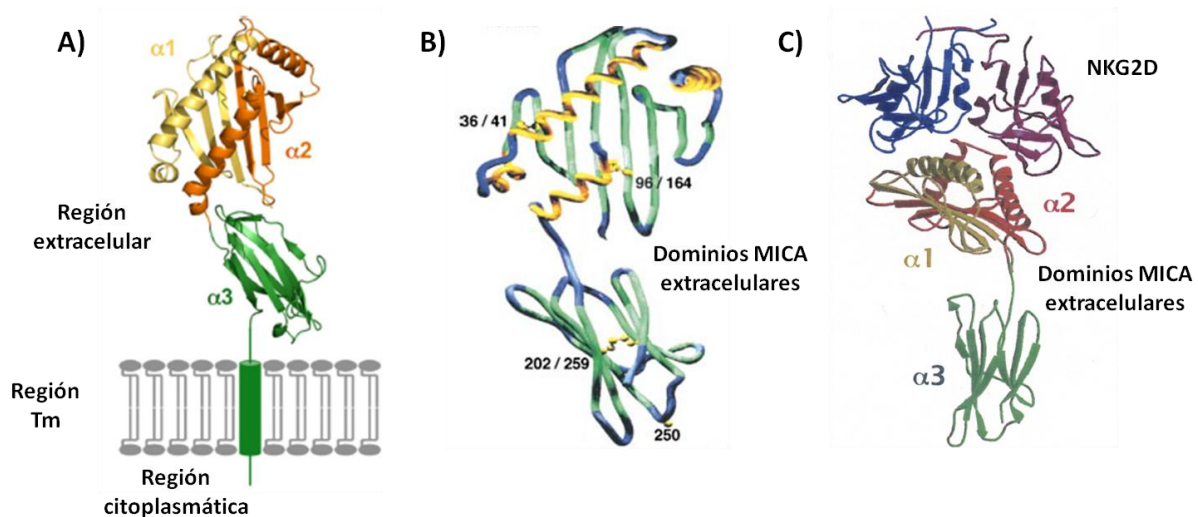


Figura 10. Representación en cintas de la proteína cadena A relacionada con MHC de clase I (MICA) plegada (A y B) y de su interacción con el receptor del grupo 2D de linfocitos *natural killer* (NKG2D) (C). (A) MICA presenta tres regiones (extracelular, transmembrana o Tm y citoplasmática) y tres dominios extracelulares $\alpha 1$ (amarillo), $\alpha 2$ (naranja) y $\alpha 3$ (verde). (B) Los dominios extracelulares se pliegan formando alfa-hélices (amarillo), beta-láminas (verde) y espirales (azul). Se muestra con un número las posiciones de las cadenas laterales de cisteína (amarillo, representadas con bolas y varillas). (C) Los dominios MICA extracelulares $\alpha 1$ - $\alpha 3$ (parte inferior, diferenciados con colores amarillo, rojo y verde, respectivamente) establecen contacto con el receptor NKG2D (parte superior, con las cadenas A y B diferenciadas con colores azul y morado, respectivamente). [Adaptado de Raulet et al. 2013 (98), Li et al. 1999 (99) y Li et al. 2001 (100)].

El ligando MICA es reconocido por receptores de activación NKG2D en la superficie de linfocitos NK, NKT, $T\gamma\delta$, $T\alpha\beta$ CD8+ y algunos $T\alpha\beta$ CD4+ (98, 101, 102). Estos ligandos se dividen en dos grupos: proteínas MIC (MICA y MICB) y proteínas de unión a la glicoproteína de CMV UL16 (ULBP1-6). La unión MICA-NKG2D activa la proteína

adaptadora DAP10 (proteína activadora DNAX-de 10kDa), que inicia una cascada de señalización que desencadena tanto la citotoxicidad de células NK como la coestimulación de los linfocitos T CD8⁺ (103). La interacción MICA-NKG2D es similar a la de MHC-TCR, de modo que la superficie superior altamente polimórfica de la molécula MICA entra en contacto directo con su receptor (Figura 10C) (100).

Hasta la fecha, se han identificado 80 proteínas MICA diferentes (91). El dominio $\alpha 2$ es el que presenta un mayor número de polimorfismos (Figura 10B) (104). El cambio de aminoácido metionina por valina en la posición 129 del dominio extracelular $\alpha 2$ determina la clasificación del ligando MICA como de unión fuerte o débil a NKG2D (105). Se han descrito 7 variantes que difieren en el número de polialaninas en su posición 296 y se corresponden con 4 (A4), 5 (A5), 6 (A6), 7 (A7), 8 (A8), 9 (A9) y 10 (A10) repeticiones de alanina en la región transmembrana. Además, en la variante A5 puede aparecer la inserción de un nucleótido de guanina después de la segunda alanina (A5.1), causando un cambio en el marco de lectura originando la aparición de un codón stop prematuro. Esta variante A5.1 codifica una proteína truncada MICA*008 (106). La elevada frecuencia del alelo MICA*008 en la población se podría explicar por la ventaja selectiva que supone, pues sólo se conoce un tipo de virus (adenovirus) capaz de escapar a la señal MICA de estrés celular, reteniendo MICA*008 en el retículo endoplasmático (107). Otras variantes truncadas de MICA son MICA*015 y MICA*017, debido a la delección de un nucleótido en el exón 4 (108). Los distintos alelos extracelulares de esta molécula muestran cierta asociación con las variantes transmembrana (Tabla 6).

Tabla 6. Asociación entre los alelos MICA (cadena A relacionada con MHC de clase I) extracelulares y los polimorfismos de repeticiones cortas en tándem (STR) de la región transmembrana (Tm).

[Adaptado de Kirijas & Spiroski 2013 (89)].

ALELO MICA EXTRACELULAR	Tm-STR
MICA*001	A4
MICA*002	A9
MICA*004	A6
MICA*007	A4
MICA*008	A5.1
MICA*009	A6
MICA*010	A5
MICA*011	A6
MICA*012	A4
MICA*016	A5
MICA*018	A4
MICA*019	A5

La expresión constitutiva de MICA varía en función del grado de N-glicosilación y se ha detectado en epitelio gastrointestinal, endotelio, monocitos, queratinocitos, fibroblastos y médula tímica (94, 109, 110). Se ha definido como una molécula de estrés celular, ya que su expresión se induce por calor, estrés oxidativo, daños en el ácido desoxirribonucleico (ADN), infección viral (principalmente por CMV) (111), enfermedad autoinmune (112) y transformación tumoral (113). También se ha detectado su expresión en linfocitos T activados y otras células no sometidas a activación o estrés celular, como mielomonocitos o DC (114, 115).

Tanto en procesos de inflamación vascular como de transformación tumoral, se detecta MICA en exosomas y soluble (sMICA), este último por la actuación de metaloproteinasas (como la desintegrina y metaloproteinasa ADAM) que lo liberan de la superficie (116). Se cree que estos mecanismos dependen de la región citoplasmática, ya que se ha demostrado que MICA*008 sólo se secreta en exosomas, mientras que MICA*019, aun presentando una secuencia aminoacídica similar, aparece únicamente de forma soluble (117). En el endotelio vascular, estos productos tienen un papel fundamental en la inmunorregulación del proceso inflamatorio, pues inactivan los receptores NKG2D, mediante su internalización (118).

En el contexto del trasplante renal, se ha visto que la expresión de MICA*008 en células endoteliales es de 7 a 10 veces mayor que la de otros alelos y que esta variante A5.1 es el principal determinante antigénico de la alorrespuesta humoral (106).

2.4.2. ANTICUERPOS ANTI-MICA

Las proteínas MICA se consideran dianas de la respuesta alogénica debido a su naturaleza polimórfica y su expresión sobre el endotelio del injerto bajo condiciones de estrés, tras el daño isquemia-reperfusión o el proceso de rechazo (119-121).

La frecuencia de los anticuerpos anti-MICA en pacientes trasplantados varía entre el 11.4-25% (78, 122-124) en el caso de anticuerpos preformados y entre el 9-34% (125-127) para los desarrollados post-trasplante. Estos son unos porcentajes destacables, sobre todo si se tiene en cuenta que la expresión de MICA en superficie es mucho menor que la de HLA y que las alorrespuestas frente a MICA se dan frente a un único locus. La respuesta humoral que genera MICA es fuerte y esto posiblemente se deba a

que los ligandos de NKG2D sirven como puente entre la inmunidad innata y la adaptativa (128).

Tabla 7. Epítomos MICA (cadena A relacionada con MHC de clase I) obtenidos por el algoritmo HLAMatchmaker (Ducquesnoy, 2008) o determinados según el patrón de reactividad de sueros humanos (Zou *et al.*, 2009 y Suárez-Álvarez *et al.*, 2009).

AUTOR DEL ESTUDIO (REFERENCIA)	NOMBRE DEL EPÍTOPO	ALELOS MICA INCLUIDOS	EPLETS/POSICIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS
Ducquesnoy, 2008 (129)			
	CMGWS	MICA*001, *002, *007, *012, *017, *018,	36C, 129M, 206GW, 215S
	AYVE	MICA*004, *006, *008, *009, *019,	25AY, 129V, 173E
Zou <i>et al.</i>, 2009 (130)			
	MICA-G1	MICA*001, *002, *007, *012, *017, *018	36G, 173K, 206G, 210W. 215S
	MICA-G2	MICA*004, *006, *008, *009, *019	206S, 210R, 215T
Suárez-Álvarez <i>et al.</i> 2009 (131)			
	Patrón de reactividad 1	MICA*001, *002, *007, *012, *017, *018	Región VII (173K, 175G, 181R)
	Patrón de reactividad 2	MICA*004, *008, *009	Región VII (173E, 175S, 181T)

Se han definido un total de 58 epítomos MICA posibles (53). Ducquesnoy *et al.* (129) describieron 38 eplets para MICA, además de dos supereplets: CMGWS y AYVE (Tabla 7). Asimismo, demostraron la existencia de los patrones algorítmicos CMGWS, AYVE,

25TC, 14W, 14G y 122V en el suero de 6 pacientes. Los epítomos MICA también se han clasificado en 14 grupos diferentes a los obtenidos virtualmente por Ducquesnoy, basándose en los patrones de reactividad o su absorción diferencial por líneas transfectadas (130). Entre ellos, encontramos 2 grupos de epítomos MICA públicos: MICA-G1 y MICA-G2 (Tabla 7). Mediante el uso de librerías solapantes de péptidos (131), se identificaron los epítomos y regiones inmunodominantes de los anticuerpos anti-MICA en el suero de receptores renales, clasificando los patrones de reactividad en dos grupos similares a los descritos por los otros autores (Tabla 7).

2.4.3. RECHAZO DEL INJERTO MEDIADO POR ANTICUERPOS ANTI-MICA

A partir del estudio de Zwirner *et al.* en el año 2000 (76), que señalaba por primera vez a MICA como una posible diana aloantigénica, se ha investigado el papel de los anticuerpos anti-MICA pre- y/o post-trasplante en la evolución del injerto.

Sumitran-Holgersson y colaboradores (77) demostraron que existe una correlación significativa entre la inmunización frente a antígenos MICA y la pérdida del injerto. En un estudio multicéntrico (n=1910), se confirmó que existe una peor supervivencia a un año en pacientes que presentan anticuerpos anti-MICA preformados (78). En 442 trasplantados renales, Cox *et al.* (132) encontraron una asociación entre los anticuerpos anti-HLA y anti-MICA preformados y la peor función del injerto. En estudios post-trasplante, también se han definido estos anticuerpos como posibles marcadores de la peor función del injerto (125, 127). Se han realizado seguimientos de 4 y 10 años, en los que se ha confirmado su efecto deletéreo (126, 133). En cohortes más pequeñas, también se ha encontrado asociación entre anticuerpos anti-MICA pre- y post-trasplante y peor evolución del injerto (75, 123, 134). Sin embargo, otros grupos

no han hallado diferencias significativas entre la presencia de anticuerpos anti-MICA pre- o post-trasplante y la evolución del trasplante (124, 135, 136) o el depósito de C4d en los episodios de rechazo humoral (137). Por lo tanto, su papel sigue siendo objeto de controversia actualmente.

Tampoco está claro el mecanismo mediante el cual podrían estar actuando en los procesos de rechazo del injerto, aunque la activación de la vía clásica, de receptores NKG2D o la ADCC se encuentran entre los más probables (94, 138).

2.4.4. ANTICUERPOS FRENTE A CÉLULAS ENDOTELIALES

Los anticuerpos anti-células endoteliales (AECA) son un grupo heterogéneo de inmunoglobulinas capaces de reconocer antígenos endoteliales constitutivos o específicos, expresados extracelular o intracelularmente (139). La mayoría de los antígenos endoteliales son monomórficos (Tabla 5). Se trata de proteínas que se pueden sintetizar tanto en el endotelio como en otras células (Figura 11), como es el caso del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R), vimentina, agrina, el fragmento LG3 de perlecano y reductasa trans-2-enoil-CoA perioxosomal (PECR) (140).

Mediante estudios de proteómica en el suero de pacientes con enfermedades autoinmunitarias se han detectado dianas específicas, como lamina A/C, vimentina, α -enolasa, proteína de unión corriente arriba lejana 2 (FUBP2), proteína precursora disulfuro-isomerasa A3 (PDIA3) (141), proteínas de choque térmico Hsp60/70 y tropomiosina (142), entre otras.

Los determinantes antigénicos de los AECA también pueden hallarse en moléculas adheridas al endotelio (antígenos “plantados”), tales como ADN o complejos ADN-

histona. Otros antígenos, como la beta-2-glicoproteína I (β 2-GPI) o el factor plaquetario 4 (PF4), adheridos al endotelio o formando complejos con los glucosaminoglicanos superficiales, podrían ser detectados por sus respectivos anticuerpos y producir inflamación vascular (143).

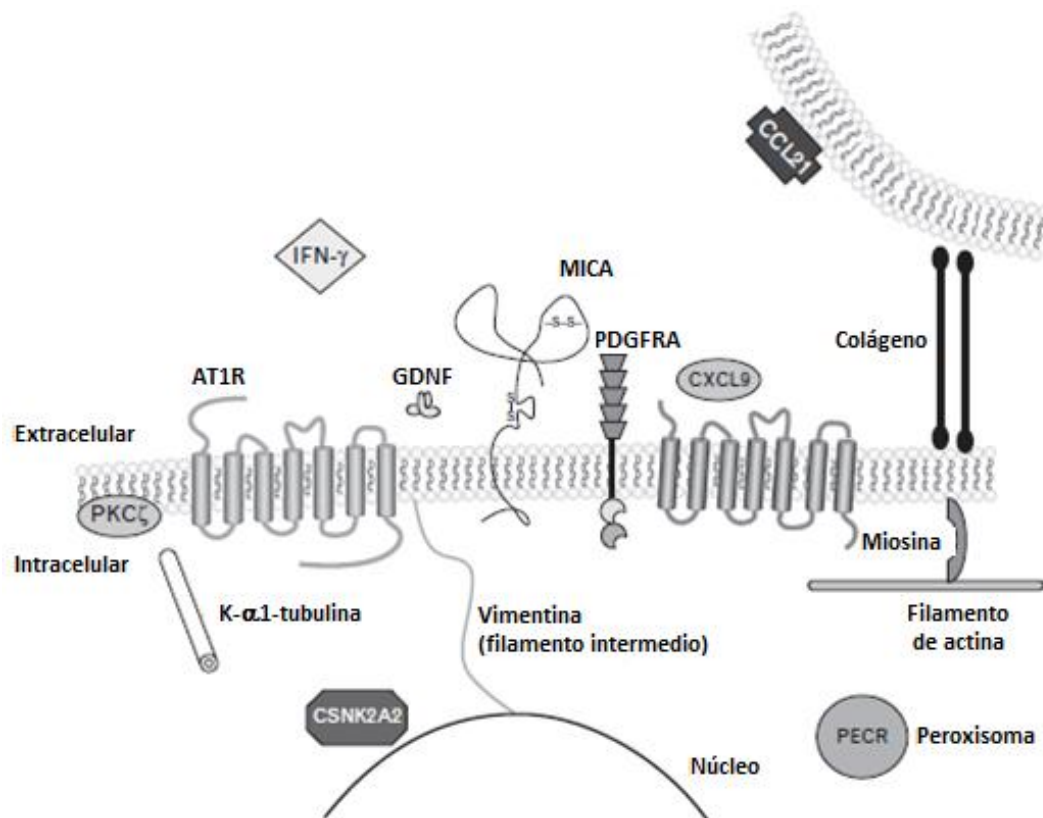


Figura 11. Localización celular de antígenos no-HLA (antígeno leucocitario humano). A parte de las proteínas cadena A relacionada con MHC de clase I (MICA) y el receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R), se incluyen las nuevas dianas detectadas mediante proteómica. CCL21: quimiocina CC ligando 21; CXCL9: quimiocina CXC ligando 9; CSNK2A2: caseína quinasa 2 alfa 2; GDNF: factor neurotrófico derivado de células gliales; PDGFRA: receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas; PECCR: reductasa trans-2-Enoil-CoA Perixosomal; PKC ζ : proteína quinasa C ζ . [Adaptado de Dragun 2012 (144)].

En el contexto del trasplante, algunos autores han identificado dianas específicas (endoglina, el ligando tirosina quinasa 3 relacionada con Fms o FLT3L, repeticiones y dominio discoidina 3 similar a EGF o EDIL3 y molécula de adhesión intercelular 4 o

ICAM-4), estudiando eluidos de células endoteliales precursoras que se habían puesto en contacto con el suero de receptores que presentaban AECA (145).

2.4.5. RECHAZO DEL INJERTO MEDIADO POR AECA

En 1995, Hourmant *et al.* (146) describieron por primera vez la presencia de AECA en 6 receptores de un injerto HLA compatible, que presentaban eventos de rechazo agudo. La presencia de AECA pre- y post-trasplante en el suero de receptores renales se ha asociado con episodios de rechazo hiperagudo, agudo y pérdida del injerto poco tiempo después del trasplante (69, 147-152), aunque también se han relacionado con la baja supervivencia a largo plazo (153). Nakagawa y colaboradores (154) encontraron en una cohorte de 22 receptores renales una mayor incidencia de AECA y títulos mayores de estos anticuerpos en pacientes con más de un episodio de rechazo. Las respuestas inmunológicas desencadenadas post-trasplante en pacientes AECA+ suelen ser de tipo más severo o resistentes a la terapia con esteroides (155). En un estudio retrospectivo de 653 receptores renales (156), se encontró un mayor número de episodios de rechazo y una mayor incidencia de glomerulitis e inflamación peritubular en el grupo AECA+. Tres años después, los mismos autores publicaron un estudio prospectivo con 226 receptores renales, que confirmó los hallazgos del artículo anterior y subrayó la importancia de los AECA *de novo* (70).

Existen dos hipótesis para el papel de AECA en el trasplante: podrían estar directamente relacionados con el proceso de rechazo; o bien, su desarrollo podría ser consecuencia del daño endotelial, favoreciendo la autoinmunidad en el individuo. Ronda y colaboradores encontraron AECA *de novo* en 3 de 4 sueros de pacientes antes de sufrir rechazo (150), mientras que Piotti *et al.* apoyan que el desarrollo de AECA

está causado por la exposición de criptoantígenos tras el daño endotelial (157). Lo que cada vez muestra más apoyo es el hecho de que existe una relación entre aloinmunidad y autoinmunidad (158, 159). Finalmente, otros autores no han encontrado relación entre la presencia de AECA y la evolución del trasplante renal (160) o cardíaco (161), por lo que sigue siendo un tema de controversia actualmente.

La unión de AECA a la molécula diana (Figura 12) puede desencadenar la muerte celular por apoptosis o por inducción de la citotoxicidad celular a través de citotoxicidad mediada por anticuerpos (CDC) o de receptores para la región Fc de la inmunoglobulina (ADCC). Otros efectos de la unión de AECA pueden ser el aumento en la expresión de moléculas de adhesión o de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, o la activación de la cascada de la coagulación, que incrementa la posibilidad de sufrir eventos trombóticos (142, 162).

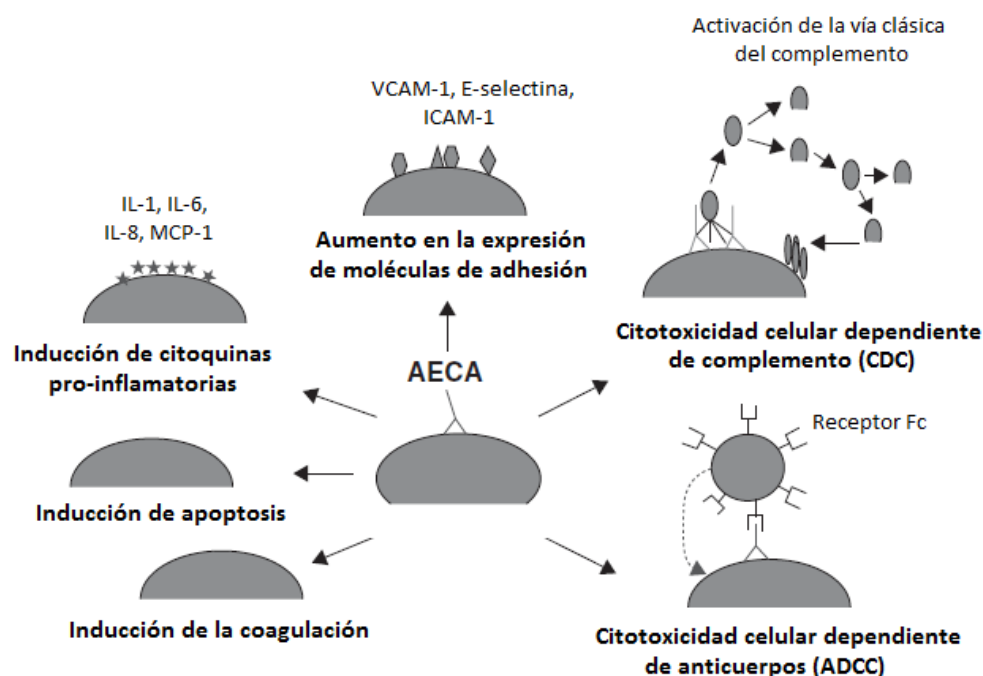


Figura 12. Esquema de las posibles funciones desencadenadas por la unión de los anticuerpos anti-células endoteliales (AECA) a sus dianas antigénicas en las células endoteliales. Los AECA en superficie

pueden activar la citotoxicidad celular (por activación de la vía clásica del complemento – CDC – o de la célula efectora que presenta receptores Fc – ADCC), aumentar la expresión de moléculas de adhesión o inducir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Además, los AECA también se han relacionado con procesos de apoptosis y la activación de la cascada de la coagulación. ICAM: molécula de adhesión intercelular; IL: interleuquina; MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1. [Adaptado de Karasawa et al. 2011 (142)].

3. BIOMARCADORES PARA LA EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA EN EL PACIENTE TRASPLANTADO

El desarrollo de nuevas técnicas que permiten detectar indicadores cuantificables y reproducibles, predictivos de procesos patogénicos o respuestas a tratamientos (biomarcadores), supone un importante avance en el campo de la medicina preventiva y personalizada. Sin embargo, su aplicación en la clínica depende de la validación de la técnica y el estudio de cohortes amplias durante largos periodos de tiempo, por lo que no siempre se encuentran disponibles comercialmente para su uso rutinario en el laboratorio de diagnóstico (163).

En el trasplante, la evaluación y el seguimiento del estado inmunológico del receptor antes y después de recibir el órgano son de vital importancia para la adecuación del tratamiento y el pronóstico de posibles rechazos. En 2013, *The Transplantation Society* publicó una guía consenso que recoge las principales técnicas de detección de anticuerpos y la relevancia de estos biomarcadores (164). En 2015, Filippone y Farber actualizaron este consenso con las últimas publicaciones al respecto (140). La sola detección de anticuerpos anti-HLA en suero como marcador del estado

inmunológico del paciente se ha probado insuficiente, por lo que es necesario el desarrollo de otro tipo de técnicas.

3.1.1. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA Y NO HLA

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-HLA

Para caracterizar el estado inmunológico de un paciente incluido en la lista de espera se realiza el panel de anticuerpos reactivos o % PRA, en el cual enfrentamos el suero de un individuo con un mínimo de 35 células con distinto tipaje HLA, obteniéndose el porcentaje de pocillos en los que vemos una reacción CDC positiva. Actualmente, se emplea el PRA calculado, basado en el cómputo de la frecuencia de una reacción positiva de una lista de incompatibilidades, calculando la probabilidad de encontrar un donante en la población general.

Los receptores hiperinmunizados (PRA>50%) son pacientes de riesgo, que suelen encontrarse en programas especiales de trasplante que favorecen las pre-pruebas cruzadas con los donantes del mismo grupo sanguíneo, incrementando así las posibilidades de encontrar un donante compatible. En estos pacientes, la eliminación de los anticuerpos preformados mediante tratamiento inmunosupresor o plasmaféresis es esencial para evitar el desarrollo de un episodio de rechazo hiperagudo, que conduciría a la trasplantectomía o pérdida del órgano durante el proceso quirúrgico (44, 165, 166).

El rechazo hiperagudo se evita enfrentando las células del donante al suero del receptor antes del trasplante, técnica conocida como prueba cruzada y descrita por Patel y Terasaki (166) en 1969. Las pruebas cruzadas renales se realizan pre-trasplante,

con el fin de seleccionar como receptores a aquellos pacientes que no se encuentren inmunizados frente al HLA del donante.

Ya que el trasplante es, por sí mismo, un evento importante de sensibilización frente a antígenos HLA, los niveles de anticuerpos deben ser monitorizados también post-trasplante. La mayor parte de los anticuerpos *de novo* son DSA. En aquellos individuos con sospecha de rechazo agudo o crónico se aconseja realizar una biopsia del injerto, para confirmar el evento de rechazo y determinar de qué tipo es (Tabla 4), además de detectar la presencia de anticuerpos citotóxicos DSA, que dirigen el diagnóstico hacia un posible rechazo mediado por anticuerpos (23). Si el individuo no sufre ningún evento de rechazo, se aconseja un seguimiento del estado inmunológico cada 3-4 meses.

La técnica más empleada para el análisis prospectivo de los anticuerpos también es la CDC (166), que utiliza las propias células del donante como diana para la detección de los anticuerpos, al igual que otras técnicas, como la citometría de flujo (FC). Sin embargo, desde los años 90 se vienen empleando con más frecuencia métodos en los que proteínas HLA recombinantes se adhieren a una superficie sólida esférica (ensayos en fase sólida de especificidades o *Single Antigen*) (Tabla 8). Estos métodos permiten definir los antígenos frente a los que se dirigen los anticuerpos, así como su intensidad media de fluorescencia (MFI).

Recientemente, se han desarrollado técnicas virtuales que predicen el resultado de una prueba cruzada en función de la MFI de los DSA preformados, teniendo en cuenta el tipaje HLA del donante. Aquellos anticuerpos con MFI entre 6.000-10.000 suelen

correlacionarse bien con una prueba cruzada por FC y CDC positiva (con una correlación media de un 92%) (167).

Tabla 8. Técnicas empleadas para la detección de anticuerpos anti-HLA en receptores de trasplante renal.

MÉTODO	DETALLES DE LAS MODIFICACIONES
• Métodos basados en células	
<i>CDC</i>	
CDC estándar	30min suero/células, 60min C'
CDC incubación extendida	60min suero/células, 120min C'
CDC-AHG	CDC estándar + AHG antes de añadir C'
CDC-DTT	Tratamiento previo del suero con DTT para eliminar IgM
<i>FC</i>	
• Métodos en fase sólida	
<i>Ensayos con microesferas</i>	
Ensayo multiplex de cribado	Microesferas recubiertas con distintos Ag HLA en su superficie
Ensayo multiplex de especificidades	Microesferas recubiertas con un solo tipo de Ag HLA en su superficie
Ensayo multiplex C1q/C3d	Para la detección específica de Ab fijadores de C'
<i>Ensayos en pocillo</i>	
Enzimoinmunoensayo (ELISA)	Pocillos con distintos Ag HLA purificados en su superficie

Ab: Anticuerpo; Ag: Antígeno; AHG: Anti-Globulina Humana; C': Complemento; CDC: Citotoxicidad Dependiente de Complemento; DTT: Ditiotreitól; ELISA: Enzimoinmunoensayo; FC: Citometría de Flujo; Ig: Inmunoglobulina.

Las técnicas basadas en microesferas han facilitado el desarrollo de métodos que detectan específicamente anticuerpos fijadores de C1q (Tabla 8), aunque con estos ensayos no se determina la capacidad de activar la vía clásica del complemento.

Recientemente, se han desarrollado nuevas técnicas que miden la deposición de C3d, con las que se detectaría la capacidad de activación de la vía clásica, pero no de la vía lítica (168). Sin embargo, existe de nuevo controversia entre aquellos autores que obtienen una asociación significativa entre la presencia de DSA fijadores de complemento y la peor evolución del trasplante (169-171) y los que no encuentran esta relación (172, 173).

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-MICA

La técnica más frecuente para detectar anticuerpos anti-MICA es el ensayo de fase sólida de cribado o de especificidades (Tabla 8). Sin embargo, a diferencia de los anticuerpos anti-HLA, no es posible realizar pruebas cruzadas por CDC o FC con linfocitos T y/o B, ya que estas células no expresan MICA en su superficie (174). Para definir la citotoxicidad de los anticuerpos, diversos autores han desarrollado ensayos de pruebas cruzadas con distintos tipos celulares. Sumitran-Holgersson y colaboradores (77) emplearon células del endotelio microvascular y células 721.221 transfectadas con MICA/B incubándolas con sueros post-trasplante de receptores que presentaban rechazos irreversibles. Zou *et al.* (175) realizaron estudios de CDC con anticuerpos monoclonales 3.2H3 y sueros de pacientes inmunizados frente a MICA*008, empleando como diana células tumorales HeLa, que expresan MICA*008 en homocigosis. El 70% de las células incubadas con el anticuerpo monoclonal morían por CDC y la absorción de los sueros con MICA*008 recombinante reducía el porcentaje de células muertas, lo que demuestra que MICA es una diana para la citotoxicidad. Otros autores también han empleado células recombinantes para realizar los ensayos de CDC con sueros de receptores cardíacos (176).

DETECCIÓN DE AECA

El método más común para detectar AECA es la inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células endoteliales humanas derivadas de vena umbilical (HUVEC), que permitió la descripción original de estos anticuerpos en 1971 (177). Una de sus ventajas es la localización de la reactividad en los distintos compartimentos celulares. Otros métodos, como el ELISA o la FC, se han empleado para aumentar la sensibilidad, siendo el ELISA la técnica más utilizada (143). Su principal ventaja es que permite cuantificar el nivel de anticuerpos, aunque la desventaja es que los antígenos unidos a la placa pueden perder su conformación nativa, dando lugar a falsos negativos y discrepancias con otras técnicas. Para lograr mantener la conformación nativa de los epítomos, las proteínas son capturadas sobre superficies celulares (CSP-ELISA) (178). Las pruebas cruzadas que detectan AECA por FC (EC-XM) utilizan el receptor de la angiopoyetina 2 (Tie2) para el aislamiento de células endoteliales precursoras (EPCs) de sangre periférica. Su principal ventaja es la rapidez y sencillo aislamiento celular (179). Otras técnicas como el inmunoblot o la inmunoprecipitación no son frecuentes, al tratarse de metodologías más complejas que sólo identifican AECA dirigidos frente a epítomos lineales. También se han realizado pruebas cruzadas por CDC con células endoteliales, pero presentan una baja sensibilidad (143). Buena parte de las discrepancias entre los diferentes estudios relacionados con AECA se debe a la falta de un método estandarizado, que permita establecer comparaciones entre grupos de pacientes.

3.1.2. OTROS BIOMARCADORES

La actividad de los linfocitos puede ser estudiada por distintas técnicas. El cultivo mixto linfocitario pone en contacto las células irradiadas del donante, para que no se dividan, con las células del receptor que, si reconocen HLA extraño, proliferarán incorporando timidina tritiada detectable mediante contadores de radiactividad. Este ensayo, que generó inicialmente grandes expectativas (180), no se ha implementado por su escasa reproducibilidad y prolongado tiempo de respuesta (181).

En 2002, se aprobó la cuantificación de la producción de ATP por linfocitos TCD4+ como ensayo adecuado para evaluar su funcionalidad (ImmuKnow) al observar que una producción baja o elevada se asociaba a un mayor riesgo de infecciones o rechazo, respectivamente (182, 183). Sin embargo, otros estudios no encuentran ningún tipo de asociación con estos factores (184, 185). Por ello, su empleo rutinario es todavía controvertido.

La molécula CD30 soluble (sCD30), que se libera por proteólisis de la superficie de las células T activadas, también puede utilizarse como biomarcador (186). Los niveles aumentados de sCD30 tanto en el suero pre- como post-trasplante de receptores se han asociado a mayor riesgo de rechazo y/o pérdida del injerto (187, 188), si bien los resultados no son concluyentes en relación con el rechazo agudo (189) y por ello no se ha extendido todavía su uso.

Varios grupos han demostrado una asociación entre el aumento en la producción de interferón gamma (IFN- γ) y peor función renal (190-192). La técnica de ELISPOT (ensayo de puntos por inmunoadsorción ligado a enzima) permite detectar la producción de citoquinas de los linfocitos del receptor en respuesta a las células

inactivadas del donante (181). Dado que se trata de un método caro y laborioso, que requiere de 24-36h de procedimiento, su uso se limita a la evaluación del estado inmunológico del paciente en lista de espera, similar al PRA (181).

Por último, en la última clasificación de Banff (Tabla 4) (23) se considera la utilidad del diagnóstico molecular mediante la detección del aumento en la expresión de genes de daño endotelial, sobre todo en ausencia de otros biomarcadores como C4d (193, 194). Sin embargo, estos hallazgos deben ser validados de forma independiente y deben definirse los genes asociados al rechazo (195). Otra técnica molecular no invasiva, pero de uso menos frecuente, es la detección de ADN libre en el suero del receptor, relacionada con el daño del injerto (196).

II. OBJETIVOS GENERALES

Los anticuerpos no-HLA pueden contribuir al deterioro del injerto renal si son capaces de reconocer dianas en éste y activar vías que lleven a la muerte o la activación celular.

El objetivo global de esta Tesis Doctoral es el estudio del significado de los anticuerpos anti-MICA y otros anticuerpos anti-endoteliales en la evolución del trasplante renal, teniendo como objetivos generales los siguientes puntos:

1. Estudiar si existe relación entre la aparición de anticuerpos anti-MICA y los eventos clásicos de sensibilización en pacientes en lista de espera de trasplante renal.
2. Describir el papel de los anticuerpos anti-MICA preformados en la supervivencia del paciente y del trasplante renal, así como en su tasa de rechazo.
3. Determinar el riesgo de rechazo del injerto renal por la presencia de anticuerpos anti-MICA preformados, independientemente de otras variables.
4. Estudiar cómo influyen los anticuerpos anti-MICA pre-trasplante sobre el filtrado glomerular y el tiempo en alcanzar niveles óptimos de creatinina.
5. Definir de forma más exhaustiva los anticuerpos anti-MICA en aquellos receptores sensibilizados, analizando las distintas especificidades y su distribución en los dos supereplets descritos (AYVE y CMGWS), tanto en presencia como ausencia de anticuerpos anti-HLA.

6. Demostrar la unión de estos anticuerpos al antígeno MICA en condiciones nativas sobre la superficie de células que lo expresan de forma constitutiva o inducida.
7. Analizar la capacidad de fijación de la región Fc de los anticuerpos anti-MICA preformados a la proteína C1q, iniciadora de la vía clásica del complemento.
8. Demostrar la activación de la citotoxicidad dependiente de complemento en el suero de receptores renales que presenten anticuerpos anti-MICA preformados.
9. Estudiar la sensibilización, pre-trasplante y *de novo*, frente a antígenos endoteliales en receptores de trasplante renal.
10. Comprobar si la presencia de AECA post-trasplante en el suero del receptor de un injerto renal está relacionada con la peor supervivencia del paciente y del injerto, así como la tasa de rechazo.
11. Determinar el riesgo de rechazo del injerto renal por la presencia de AECA post-trasplante, independientemente de otras variables.
12. Caracterizar los patrones de inmunofluorescencia indirecta de los AECA y su posible asociación con los eventos de rechazo.

III. PUBLICACIONES

CAPÍTULO 1

Harmful effect of preformed anti-MICA antibodies on renal allograft evolution in early posttransplantation period

Elena Sánchez-Zapardiel, María J. Castro-Panete, Marcela Castillo-Rama, Pablo Morales, David Lora-Pablos, Diana Valero-Hervás, Raquel Ruíz-García, Jacqueline Apaza, Paloma Talayero, Amado Andrés, José M. Morales and Estela Paz-Artal

Transplantation 2013; 96 (1): 70-78

	Página
Objetivos	74-75
Conclusiones	76
Publicación	77

OBJETIVOS

La presencia de anticuerpos frente a antígenos del sistema HLA ha sido ampliamente relacionada con una peor evolución del trasplante, ya que éstos son los principales desencadenantes de las respuestas mediadas por anticuerpos. El estudio de biopsias renales en pacientes con rechazos humorales ha permitido establecer esta relación y, en consecuencia, la monitorización del nivel de anticuerpos anti-HLA supone actualmente una herramienta muy útil en la predicción de la evolución de los injertos. Sin embargo, ciertos pacientes sin niveles detectables de anticuerpos anti-HLA también desarrollan respuestas humorales, por lo que deben de existir otros antígenos distintos al HLA que estén promoviendo este tipo de respuestas inmunológicas.

La caracterización de estas nuevas dianas y el conocimiento de los mecanismos que conducen a su sensibilización nos permiten ampliar la información sobre el estado inmunológico del individuo trasplantado y, por lo tanto, actuar en consecuencia modificando su tratamiento inmunosupresor. El antígeno MICA es una proteína polimórfica que se expresa en situaciones de estrés celular y, en el contexto del trasplante, se asocia al daño por isquemia-reperfusión. Por lo tanto, la presencia de anticuerpos anti-MICA en el suero de pacientes antes de recibir un trasplante renal puede ser pronóstico de una peor evolución del injerto.

Por todo esto, realizamos un estudio retrospectivo en una población de 727 receptores renales trasplantados entre los años 2005-2011 en el Hospital 12 de Octubre (Madrid). Los objetivos propuestos son:

1. Estudiar si existe relación entre la aparición de anticuerpos anti-MICA y los eventos

clásicos de sensibilización en pacientes en lista de espera de trasplante renal.

2. Describir el papel de los anticuerpos anti-MICA preformados en la supervivencia del paciente y del trasplante renal, así como en su tasa de rechazo.

3. Determinar el riesgo de rechazo del injerto renal por la presencia de anticuerpos anti-MICA preformados, independientemente de otras variables.

CONCLUSIONES

1. En nuestra cohorte de receptores de trasplante renal, el desarrollo de anticuerpos anti-MICA y anti-HLA previos al trasplante son eventos independientes. La sensibilización frente a antígenos MICA no se encuentra asociada a los eventos clásicos de inmunización frente a moléculas HLA, como son los trasplantes previos y los embarazos. Tampoco encontramos una asociación entre la generación de anticuerpos anti-MICA y el contacto previo con CMV, cuya presencia se asocia con un incremento en la expresión del antígeno MICA por parte de la célula infectada.
2. Los anticuerpos anti-MICA preformados tienen un impacto negativo sobre la tasa de rechazo y la supervivencia del injerto renal, pero no sobre la supervivencia del paciente. En los tres primeros meses post-trasplante, la coexistencia de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA preformados aumenta los eventos de rechazo y disminuye la supervivencia del injerto.
3. La presencia de anticuerpos anti-MICA preformados confiere el mayor riesgo de rechazo del trasplante renal. Este efecto se observa durante los primeros meses post-trasplante, en que un PRA positivo mayor del 0% y el sexo femenino del donante del riñón también suponen un mayor riesgo de rechazo del injerto, de forma independiente a la presencia de anticuerpos anti-MICA.

CAPÍTULO 1

PUBLICACIÓN

Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period

Elena Sánchez-Zapardiel,^{1,5} María J. Castro-Panete,^{1,2} Marcela Castillo-Rama,¹ Pablo Morales,^{1,2} David Lora-Pablos,² Diana Valero-Hervás,¹ Raquel Ruiz-García,¹ Jacqueline Apaza,³ Paloma Talayero,¹ Amado Andrés,³ José M. Morales,^{2,3} and Estela Paz-Artal^{1,2,4}

Background. Pretransplantation anti major histocompatibility complex class I chain related molecule A (MICA) sensitization is an uncommon event and its role on kidney graft evolution is not completely defined.

Methods. A retrospective study of patients transplanted between 2005 and 2011 in our center (n=727) was performed. Recipients were classified in four groups, according either to multiplexed flow cytometry recorded anti-human leukocyte antigen (HLA) and anti-MICA antibodies or to percent panel-reactive antibody (PRA; by complement-dependent cytotoxicity) and anti-MICA antibodies.

Results. In the total cohort, 52 (7.15%) patients had preformed anti-MICA antibodies, and these were not related with anti-HLA, previous transplantations, or recipient female sex (potential pregnancies). Kaplan Meier curves showed global allograft survival differences ($P=0.042$) mostly due to pronounced decrease in PRA+MICA+ group early after transplantation. Biopsy-proven allograft rejection rate increased after month 12 in PRA+MICA- group and was higher early after transplantation in PRA+MICA+ group ($P=0.033$). In paired comparisons, rejection incidence was superior in PRA+MICA- versus PRA-MICA- patients (17% vs. 7%; $P=0.007$) at 24 months, confirming the widely reported deleterious effect of PRA+ status, but at 3 months rejection was higher in PRA+MICA+ versus PRA-MICA- patients (14% vs. 2%; $P=0.009$). Among patients categorized according anti-HLA and anti-MICA antibodies, the most striking difference in rejection was observed at 3 months (8% in HLA-MICA+ vs. 2% in HLA-MICA- patients; $P=0.032$). In the multivariate analysis, HLA-MICA+ status at 3 months independently conferred the highest risk for rejection (odds ratio, 5.07; $P=0.049$).

Conclusions. Pretransplantation sensitization against MICA and HLA are independent events. Preformed anti-MICA antibodies independently increase risk for kidney rejection and enhance the deleterious effect of PRA+ status early after transplantation.

Keywords: Anti-MICA antibodies, Pretransplantation, Renal transplant, Rejection.

(*Transplantation* 2013;96: 70–78)

Anti-human leukocyte antigen (HLA) sensitization is well known to predict worse posttransplantation evolution in kidney transplant recipients mostly because of its implication in antibody-mediated rejection (1–3). However, allo-immune or autoimmune responses against antigens other than HLA are likely also contributing to renal transplant outcome (4–6). The polymorphic nature of major histocompatibility

complex class I chain-related molecule A (MICA), with more than 85 alleles described (<http://www.imgt.org>), together with its expression on endothelial cells (7), makes it possible that immunization against MICA alloantigens could be involved in antibody-mediated rejection. This effect could depend on diverse mechanisms, including the capacity to mediate complement-dependent cytotoxicity (CDC) attributed to anti-MICA antibodies (8). MICA gene seems to be transcribed in

This work was supported by Fundación Mutua Madrileña 2005-095 and FIS ISCIII 09/02023.

The authors declare no conflicts of interest.

¹ Department of Immunology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

² I+12 Research Institute, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

³ Department of Nephrology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

⁴ Facultad de Medicina Universidad Complutense, Madrid, Spain.

⁵ Address correspondence to: Elena Sánchez-Zapardiel, B.Sc., M.Sc., Immunology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avda. de Córdoba s/n, 28041, Madrid, Spain.

E-mail: esanchezz@salud.madrid.org

E.S.-Z., A.A., J.M.M. and E.P.-A. participated in the research design and writing of the article. E.S.-Z. and R.R.-G. performed the antibodies tests. E.S.-Z., D.L.-P. and D.V.-H. participated in the data analysis and writing of the article. M.J.C.-P., M.C.-R., P.M., P.T. and J.A. collected the information of patients for the databases.

Received 8 January 2013. Revision requested 28 January 2013.

Accepted 26 March 2013.

Copyright © 2013 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN: 0041-1337/13/9601-70

DOI: 10.1097/TP.0b013e3182943506

TABLE 1. Epidemiologic and clinical features in anti-MICA+ and anti-MICA- patients

Characteristics	MICA- group (n=675 [93%])	MICA+ group (n=52 [7%])	P
Transplantation year, n (%)			
2005	20 (3)	2 (4)	0.006
2006	98 (15)	16 (31)	
2007	111 (16)	6 (12)	
2008	110 (16)	11 (21)	
2009	110 (16)	4 (8)	
2010	114 (17)	12 (23)	
2011	112 (17)	1 (1)	
Transplant number, n (%)			
First transplant	603 (89)	44 (85)	0.529
Subsequent transplant	72 (11)	8 (15)	
Type of dialysis, n (%)			
Hemodialysis	538 (80)	37 (71)	0.224
Peritoneal dialysis	81 (12)	11 (21)	
Predialysis	56 (8)	4 (8)	
Length of dialysis, months (range)	25.4±30.1 (0 278)	28.0±24.2 (0 94)	0.544
Cold ischemia time, hr (range)	17.6±6.7 (0.3 33.6)	17.4±6.6 (1.0 30.0)	0.836
Recipient weight, kg (range)	69±13 (33 117)	71±15 (53 108)	0.291
Recipient sex, n (%)			
Male	422 (63)	30 (58)	0.563
Female	253 (37)	22 (42)	
Donor sex, n (%)			
Male	440 (65)	30 (58)	0.383
Female	235 (35)	22 (42)	
Recipient age, years (range)	54±16 (19 84)	55±15 (16 82)	0.663
Donor age, years (range)	52±18 (7 85)	52±19 (18 82)	1.000
Donor category, n (%)			
Living donor	29 (4)	2 (4)	0.974
Donation after cardiac death	161 (24)	13 (25)	
Heart-beating donor	485 (72)	37 (71)	
HLA mismatches, n (%)			
0 1	11 (2)	1 (2)	0.326
2 4	371 (55)	23 (44)	
5 6	293 (43)	28 (54)	
% PRA, n (%)			
0%	609 (90)	46 (88)	0.822
>0%	66 (10)	6 (12)	
Recipient CMV antibodies			
CMV- serum	75 (11)	3 (6)	0.311
CMV+ serum	600 (89)	49 (94)	

CMV, cytomegalovirus; HLA, human leukocyte antigen; PRA, panel-reactive antibody.

virtually all body tissues (9) and tissular expression is enhanced by stress conditions such as cytomegalovirus (CMV) infections (10), autoimmune diseases (11), tumoral transformation (12), and ischemia-reperfusion injury (13, 14).

In the setting of kidney transplantation, Zwirner et al. (15) suggested for the first time that MICA antigens could be a new target for allorecognition and presumably recognized by antibodies in the recipient serum. Several studies were next accomplished to identify the anti-MICA sensitization mechanisms in waiting list patients and to decipher the role of anti-MICA antibodies in graft evolution. Sumitran-

Holgerson et al. (16) demonstrated a significant correlation for pretransplantation and posttransplantation anti-MICA humoral immunity and graft loss and recommended the routinely detection of anti-MICA antibodies before transplantation. In a multicenter study including the largest population analyzed to the moment, the authors reported decreased 1-year allograft survival in patients with pretransplantation anti-MICA antibodies and this association was stronger when patients were not sensitized against HLA antigens before transplantation (17). Cox et al. (18) reported MICA mismatches as an independent significant factor associated with the presence

TABLE 2. Treatment and original diseases in MICA+ and MICA- patients

Characteristics	MICA- group (n=675 [93%])	MICA+ group (n=52 [7%])	P
Treatment combinations			
Double therapy (TAC+MMF/AZA)	6 (1)	1 (2)	0.733
Triple therapy (CE+TAC+MMF/AZA)	146 (22)	12 (23)	
Quadruple therapy (mAb+CE+TAC+MMF/AZA)	523 (77)	39 (75)	
Calcineurin inhibitors			
Cyclosporine	7 (1)	2 (4)	0.186
TAC	652 (97)	49 (94)	
No calcineurin inhibitors	16 (2)	1 (2)	
Antiproliferatives			
AZA	69 (10)	5 (10)	0.933
MMF	597 (88)	46 (88)	
No antiproliferatives	9 (2)	1 (2)	
mTOR inhibitors			
Everolimus	7 (1)	1 (2)	0.447
Sirolimus	4 (1)	1 (2)	
No mTOR inhibitors	664 (98)	50 (96)	
Induction			
Induction (basiliximab/Tg)	538 (80)	42 (81)	0.999
No induction	137 (20)	10 (19)	
Corticosteroids			
CE	666 (99)	52 (100)	0.999
No CE	9 (1)	0 (0)	
Other treatments			
IVIg	1 (<1)	0 (0)	
Plasmapheresis	2 (<1)	0 (0)	
Rituximab	2 (<1)	0 (0)	
Belatacept	4 (<1)	0 (0)	
Original disease			
Vascular nephropathy (nephrosclerosis, ischemic nephropathy, malignant hypertension, atherosclerosis)	117 (17)	9 (17)	0.768
Diabetes mellitus (diabetic nephropathy)	190 (28)	8 (15)	
Glomerulonephritis/vasculitis	148 (22)	17 (33)	
Interstitial nephropathy	51 (8)	7 (13)	
Polycystic kidney disease	73 (11)	8 (15)	
Other diseases (kidney reflux, kidney tumors, glomerular hyperfiltration, single kidney)	103 (15)	11 (21)	
Unknown etiology	64 (9)	3 (6)	

AZA, azathioprine; CE, corticosteroids; IVIG, intravenous immunoglobulin; mAb, monoclonal antibody; MMF, mycophenolate mofetil; mTOR, mammalian target of rapamycin; TAC, tacrolimus; Tg, thymoglobulin.

of MICA antibodies, and both HLA and MICA antibodies significantly associated with acute rejection and graft dysfunction. Long follow-up studies, at 4 and 10 years, confirmed the association of anti-HLA and anti-MICA antibodies to graft failure (19, 20). Conversely, other studies did not find any association between pretransplantation or posttransplantation anti-MICA antibodies and C4d deposition in patients with acute humoral rejection (21) or an independent pathogenic role of anti-MICA antibodies in long-term renal graft injury and renal graft outcomes (22, 23).

The aim of this study is to analyze the role of preformed MICA antibodies on graft survival, patient survival, and rejection rate in our single-center population of kidney

transplant recipients. Our results indicate that preexisting anti-MICA antibodies significantly increase risk for kidney grafts rejection. This effect is independent from anti-HLA sensitization and specially noticed in the first 3 months after transplantation.

RESULTS

Generation of Pretransplantation Anti-MICA and Anti-HLA Antibodies Are Independent Events

First analysis of our cohort showed that there were no significant epidemiologic or clinical differences between anti-MICA- and anti-MICA+ patient populations. Donor

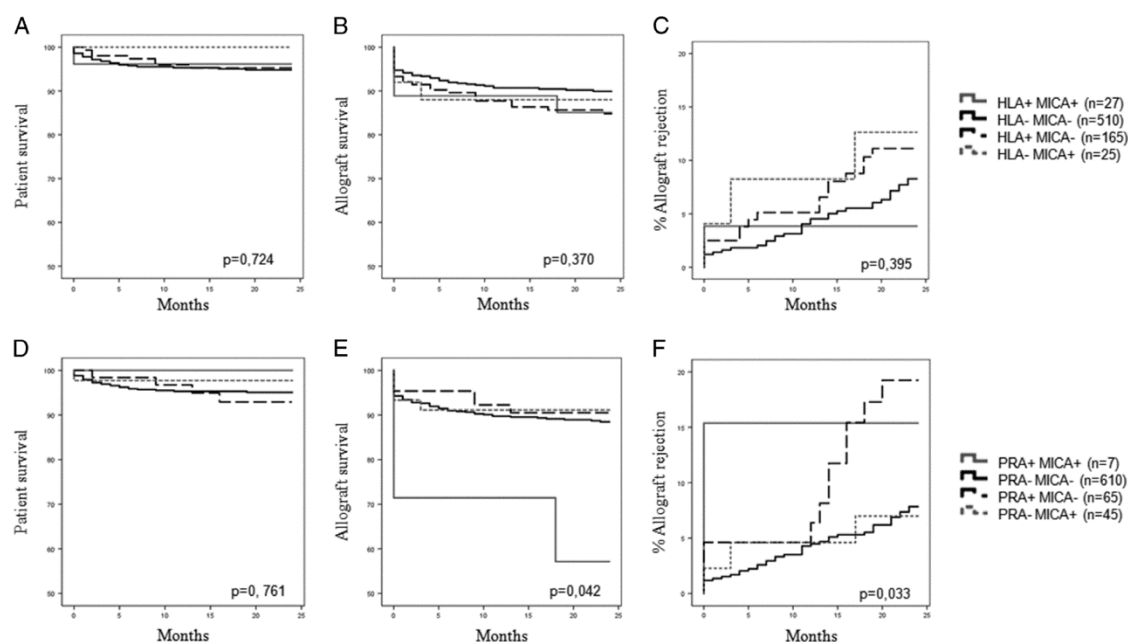


FIGURE 1. Effect of combined anti-HLA and anti-MICA status (A–C) or % PRA and anti-MICA status (D–F) on patient survival (A and D), allograft survival (B and E), and allograft rejection (C and F). Global *P* values were obtained at 24 months by Kaplan–Meier analysis.

and recipient sex, number of HLA mismatches, positive/negative panel-reactive antibody (PRA), positive/negative CMV serology (Table 1), and drugs or treatment combinations (Table 2) were similarly distributed between MICA- and MICA+ patients. When original renal disease was analyzed, MICA- patients showed a higher proportion of diabetes mellitus (28%), whereas in MICA+ patients glomerulonephritis and vasculitis were the most frequent diagnosis (33%), although these differences did not reach statistical significance (Table 2).

We investigated whether pretransplantation anti-MICA and anti-HLA antibodies generation were independent events or, on the contrary, both were linked and hence probably related to the same sensitization mechanisms. In our series, 27 of 52 MICA+ patients were also HLA+ (4% of total cohort), whereas the remaining 25 (3%) were HLA-. Among MICA- patients, 165 (23%) had anti-HLA antibodies and 510 (70%) were also anti-HLA-negative. Fisher's exact test showed no statistical significance in the distribution of these frequencies ($P=0.082$). Consistently, we did not find statistically significant association between classic anti-HLA sensitization events, such as previous transplantations or recipient female sex (potential pregnancies), and the presence of anti-MICA antibodies (Table 1).

Preformed Anti-MICA Antibodies Increase Allograft Rejection Rate

To further explore the role of preformed anti-MICA antibodies independently from the anti-HLA status of the recipient, patients were categorized into four groups. First classification was performed according to the presence

(+) or absence (-) of anti-HLA and anti-MICA antibodies as recorded by multiplexed flow cytometry: HLA+MICA+ (n=27); HLA-MICA- (n=510); HLA+MICA- (n=165), and HLA-MICA+ (n=25). A second distribution of patients was made according to the presence of anti-HLA antibodies as measured by % PRA (PRA+ or PRA-) and flow cytometry-recorded-anti-MICA antibodies: PRA+MICA+ (n=7), PRA-MICA- (n=610), PRA+MICA- (n=65), and PRA-MICA+ (n=45).

During 24 months after transplantation, patient survival, allograft survival, delayed graft function (defined as need of dialysis the first week after transplantation), and allograft rejection rate did not show differences in global comparisons among patient groups classified according to anti-HLA and anti-MICA status (Fig. 1A–C, respectively). Among patients classified according to PRA and anti-MICA status, patient survival showed no differences (Fig. 1D), but allograft survival showed global significant differences ($P=0.042$), mostly due to pronounced survival decrease of PRA+MICA+ patients from early times after transplantation (Fig. 1E). Allograft rejection rate increased after month 12 in PRA+MICA- group and, interestingly, was clearly higher early after transplantation in PRA+MICA+ group, rendering global comparison among patient groups statistically significant ($P=0.033$) (Fig. 1F and Table 3A). Delayed graft function showed global significant differences ($P=0.024$) due to a higher frequency in PRA-MICA- patients, suggesting a major role of factors other than antibodies.

When paired comparisons between groups were considered by posttransplantation time periods, patient survival and graft survival were similar, but significant differences in

TABLE 3. Allograft rejection rate at 3, 6, 12, and 24 months after transplantation in patient groups (global and paired comparisons)

	Allograft rejection										
	Allograft rejection, n (%)				Pairwise <i>P</i> values						
	(1) PRA+MICA+ (n=7)	(2) PRA-MICA- (n=610)	(3) PRA+MICA- (n=65)	(4) PRA-MICA+ (n=45)	<i>P</i>	(1) vs. (2)	(1) vs. (3)	(1) vs. (4)	(2) vs. (3)	(2) vs. (4)	(3) vs. (4)
(A)											
0–3 months	1 (14)	10 (2)	3 (5)	2 (4)	0.053	0.009	0.292	0.272	0.100	0.178	0.968
0–6 months	1 (14)	15 (2)	3 (5)	2 (4)	0.164	0.035	0.292	0.272	0.318	0.422	0.968
0–12 months	1 (14)	25 (4)	4 (6)	2 (4)	0.481	0.141	0.413	0.272	0.481	0.933	0.694
0–24 months	1 (14)	42 (7)	11 (17)	3 (7)	0.041	0.349	0.928	0.430	0.007	0.842	0.095
	Allograft rejection										
	Allograft rejection, n (%)				Pairwise <i>P</i> values						
(B)					<i>P</i>	(1) vs. (2)	(1) vs. (3)	(1) vs. (4)	(2) vs. (3)	(2) vs. (4)	(3) vs. (4)
0–3 months	1 (4)	9 (2)	4 (2)	2 (8)	0.196	0.459	0.704	0.523	0.579	0.032	0.143
0–6 months	1 (4)	10 (2)	8 (5)	2 (8)	0.097	0.523	0.797	0.523	0.043	0.046	0.515
0–12 months	1 (4)	21 (4)	8 (5)	2 (8)	0.799	0.905	0.797	0.523	0.658	0.351	0.515
0–24 months	1 (4)	36 (7)	17 (10)	3 (12)	0.397	0.480	0.258	0.276	0.175	0.427	0.876

graft rejection rate were also observed (Table 3). In the total observation period (24 months after transplantation), incidence of rejection was superior in PRA+MICA- cohort versus PRA-MICA- patients (17% vs. 7%; $P=0.007$), confirming the widely reported deleterious effect of panel-reactive HLA antibodies on the evolution of kidney allografts. Differences in allograft rejection rate were highest when comparing PRA+MICA+ patients versus PRA-MICA- patients at 3 months after transplantation (14% vs. 2%; $P=0.009$) and were still observed at 6 months (14% vs. 2%; $P=0.035$) (Table 3A). Among patients categorized according anti-HLA and anti-MICA antibodies, the most striking difference was observed at 3 months, when HLA-MICA+ patients had a graft rejection rate of 8% compared with 2% in HLA-MICA- patients ($P=0.032$) (Table 3B), an effect also perceived in graft rejection curves (Fig. 1C).

Conjointly, these results suggest that preformed anti-MICA antibodies increase allograft rejection rate and particularly enhance the deleterious effect of PRA+ status on renal allograft evolution. This effect is especially noticed early after transplantation.

HLA-MICA+ Status in Early Posttransplantation Period Confers the Highest Risk for Graft Rejection

The relationship between allograft rejection events and preformed serum antibodies was analyzed by binary logistic regression. The univariate study included also clinical and epidemiologic variables that were associated with allograft rejection with $P < 0.1$ in a previous Kaplan–Meier analysis (data not shown).

Most significant associations were found when analyzing patients stratified by anti-HLA and anti-MICA sensitization (Table 4). Remarkably, HLA-MICA+ status emerged as an independent factor for allograft rejection in the multivariate analysis, and patients belonging to HLA-MICA+ group at 3 months showed the highest risk for graft rejection (odds ratio [OR], 5.07; $P=0.049$ in the multivariate analysis). This significance was not observed when recipients were classified according to % PRA and anti-MICA antibodies probably due to the small number of patients in some categories ($n=7$ in PRA+MICA+ group). PRA percentage $>0\%$ and donor female sex appeared also as independent variables for rejection in first 3 months after transplantation. No other significant associations were observed during the 6- and 12-month posttransplantation period, either considering patients according to anti-HLA and anti-MICA antibodies or % PRA plus anti-MICA antibodies. Finally, at 24 months, positive % PRA and four to six HLA mismatches conferred risk and were independently associated with allograft rejection (OR, 2.73; $P=0.006$ and OR, 2.41; $P=0.021$, respectively; Table 4), corroborating extensive evidence from previous results.

DISCUSSION

We have first observed that preformed anti-MICA antibodies are present in 7.15% of patients waiting for a renal transplant in our series. This is the lowest frequency reported because other authors found preexisting anti-MICA antibodies in 11.4% to approximately 25% of recipients (17, 22, 24, 25). These discrepancies could be

principally attributed to technical differences in assessing anti-MICA antibodies, including different MICA antigen panels, and multiplexed flow cytometry–based reagents and evaluation software coming from different manufacturers. The populations studied are also different regarding first and subsequent transplant proportions, gender distribution among donors and recipients, or other features.

In the present study, data were not available to exhaustively analyze if classic anti-HLA-sensitizing events induced also anti-MICA antibodies in waiting list subjects. In our patients, however, anti-MICA sensitization was more frequent in male than in female, similarly to observations from other series (17, 22), which decreases the probability that pretransplantation anti-MICA antibodies could be associated to pregnancy. Previous transplants were not more frequent in MICA+ versus MICA- patients, similarly to the observation recorded by Zou et al. (17) in the multicenter series. Transfusions were possibly less frequent in our series, which included recipients from 2005, than in the multicenter cohort (17), which included recipients from 1990 when transfusing patients in the waiting lists was a more common practice. These observations showing that pretransplantation sensitization against MICA and HLA occur independently are also statistically supported by the demonstration that MICA+ patients are randomly distributed among HLA+ and HLA- groups. Nevertheless, *P* value is not far from significance (*P*=0.082) and may be interpreted as a tendency that needs future investigation.

Lemy et al. (22) suggested that mechanisms other than alloimmune response versus MICA-different antigens may drive the generation of MICA antibodies and showed that uremia per se was still associated with a twofold increase prevalence of MICA immunization in patients not previously transplanted or transfused. Moreover, these authors demonstrated that 20% of IgG antibodies against MICA in chronic kidney patients were autoreactive. Based on this concept, and because CMV infection has been shown to up-regulate the expression of some MICA antigen forms and consequently to generate a possible anti-MICA humoral response (10, 26), we analyzed whether anti-CMV positivity was more frequent in MICA+ than in MICA- patients, but an association was not found (Table 1). We also tested the hypothesis that the production of anti-MICA antibodies could be related to humoral responses in the context of autoimmune causative renal diseases (6) and observed more glomerulonephritis/vasculitis in MICA+ than in MICA- patients, although differences were not significant (Table 2). Anti-MICA sensitization might be a manifestation of a previous-to-transplant event in the recipient, characterized by augmentation of MICA expression. MICA ligands could activate NKG2D-dependent pathways in NK and CD8 T cells, increasing risk of damage to graft after transplantation by an alternative or additional mechanism to that mediated by antibodies against MICA. To shed light on these questions, MICA donor and recipient typing would provide a detailed definition of preformed anti-MICA antibodies as donor specific, nondonor specific, or autoreactive, helping to understand if responses against MICA antigens after transplantation are mostly allogeneic or autoimmune. Identification of C4d in rejection biopsies would strengthen that anti-MICA antibodies play a major pathogenic role.

The main finding of this work is that pretransplantation anti-MICA antibodies increase risk for kidney rejection, a result repeatedly obtained by using several diverse statistical approaches. Moreover, categorization of patients considering also anti-HLA sensitization has allowed demonstrating that the effect of anti-MICA antibodies occurs independently from the presence of anti-HLA antibodies. In addition, by analyzing graft evolution at different posttransplantation times, preformed anti-MICA antibodies are shown to increase graft rejections particularly early after transplantation. The association of antibodies against MICA antigens and allograft rejection early in the posttransplantation period and stronger in recipients without panel-reactive HLA antibodies has been also observed in the largest, multicenter cohort (17). Although these authors computed only actuarial graft survival rates, we were able to obtain a more detailed definition on the role of pretransplantation anti-MICA antibodies by separately analyzing their effect on biopsy-proven rejection rate and on graft loss. However, less potent statistical significances were obtained by us, probably due, among other causes, to the smaller sample size in our case. On the contrary, our patients were probably treated with more modern and potent drugs allowing the rescue of a higher number of organs after the rejection event, resulting in less graft losses. Given the low prevalence of pretransplantation MICA antibodies, the study of large series is mandatory to obtain solid results. Future efforts to define donor or nondonor specificity of anti-MICA antibodies will provide a better understanding of their role in renal transplant outcome.

Although we have not specifically analyzed the meaning of donor/recipient sex match in our cohort, more graft rejections were observed in transplants from female versus male donors. Other authors have found that worse glomerular function or decreased graft survival are more common in kidneys from female donors (18, 27). Whether these observations are linked to gender-related minor histocompatibility antigens mismatching or a “nephron-dose effect” awaits further investigation.

In conclusion, this study reports a negative impact of preformed anti-MICA antibodies on kidney allografts. Because waiting list patients with preformed anti-MICA antibodies have higher risk for rejection the first months after transplantation, we postulate that pretransplantation screening of anti-MICA sensitization may contribute to a better care of kidney recipients.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

We retrospectively analyzed 727 patients (452 men and 275 women; mean age, 54±16 years) who received a kidney transplant among 2005 and 2011 in our hospital. The study was performed under informed consent and approved by the institutional review board (reference 10/014). Pretransplantation serum samples (one pretransplantation sera for 720 recipients and two for 7 recipients because of successive transplants during the period studied) were collected the day of the transplantation and frozen at -80°C until analysis of the antibodies. Allograft survival, patient survival, and rejection events were recorded for each kidney transplant recipient. Graft loss and patient exitus were considered to calculate allograft and patient survival, respectively. Allograft rejection was defined as biopsy-proven rejection. These three factors were analyzed at 3, 6, 12, and 24 months after transplantation.

TABLE 4. Allograft rejection univariate and multivariate analyses in patients categorized by anti-HLA and anti-MICA antibodies

	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Allograft rejection 0–3 months (n=709)				
Preformed serum antibodies				
HLA+MICA+	2.15 (0.26–17.58)	0.477		
HLA+MICA-	1.39 (0.42–4.59)	0.584		
HLA-MICA+	4.85 (0.99–23.74)	0.051	5.07 (1.01–25.47)	0.049
HLA-MICA-	Reference		Reference	
% PRA				
>0%	3.15 (0.99–10.04)	0.052	3.90 (1.01–15.04)	0.048
0%	Reference		Reference	
Donor sex				
Female	3.11 (1.12–8.66)	0.030	3.09 (1.10–15.04)	0.032
Male	Reference		Reference	
Baseline diagnosis				
Vascular	1.10 (0.31–3.93)	0.880		
DM	0.61 (0.17–2.17)	0.445		
GN-Vasculitis	0.00 (0.00–0.00)	0.995		
Interstitial NP	0.77 (0.10–5.90)	0.797		
Polycystic	1.87 (0.52–6.72)	0.336		
Allograft rejection 0–6 months (n=703)				
Preformed serum antibodies				
HLA+MICA+	1.93 (0.24–15.63)	0.539		
HLA+MICA-	2.57 (1.00–6.62)	0.051	2.59 (0.99–6.77)	0.052
HLA-MICA+	4.36 (0.90–21.04)	0.067	3.73 (0.76–18.40)	0.106
HLA-MICA-	Reference		Reference	
Donor sex				
Female	2.49 (1.04–6.00)	0.041	2.35 (0.97–5.72)	0.060
Male	Reference		Reference	
HLA mismatches				
4–6	3.60 (0.83–15.61)	0.087	3.69 (0.84–16.14)	0.084
0–3	Reference		Reference	
Baseline diagnosis				
Vascular	1.13 (0.37–3.41)	0.833		
DM	0.62 (0.21–1.87)	0.397		
GN-Vasculitis	0.00 (0.00–0.00)	0.995		
Interstitial NP	0.57 (0.08–4.32)	0.586		
Polycystic	2.59 (0.92–7.27)	0.071	2.34 (0.81–6.70)	0.115
Allograft rejection 0–12 months (n=699)				
Preformed serum antibodies				
HLA+MICA+	0.90 (0.17–6.93)	0.917		
HLA+MICA-	1.20 (0.52–2.76)	0.673		
HLA-MICA+	2.03 (0.45–9.18)	0.358		
HLA-MICA-	Reference			
Donor sex				
Female	1.87 (0.92–3.81)	0.084	1.80 (0.88–3.68)	0.107
Male	Reference		Reference	
HLA mismatches				
4–6	2.67 (0.93–7.73)	0.069	2.64 (0.91–7.66)	0.073
0–3	Reference		Reference	

(Continued on next page)

TABLE 4. (Continued)

	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
Baseline diagnosis				
Vascular	1.11 (0.45 2.75)	0.828		
DM	0.48 (0.18 1.27)	0.139		
GN-vasculitis	0.34 (0.10 1.13)	0.079	0.35 (0.10 1.16)	0.084
Interstitial NP	1.70 (0.57 5.01)	0.340		
Polycystic	1.91 (0.76 4.78)	0.169		
Allograft rejection 0–24 months (n=686)				
Preformed serum antibodies				
HLA+MICA+	0.51 (0.07 3.85)	0.512		
HLA+MICA-	1.53 (0.83 2.80)	0.172		
HLA-MICA+	1.80 (0.51 6.30)	0.358		
HLA-MICA-	Reference			
% PRA				
>0%	2.71 (1.36 5.40)	0.005	2.73 (1.33 5.59)	0.006
0%	Reference		Reference	
Recipient sex				
Female	1.65 (0.96 2.84)	0.069	1.59 (0.91 2.80)	0.104
Male	Reference		Reference	
Donor sex				
Female	1.77 (1.03 3.07)	0.041	1.69 (0.97 2.96)	0.064
Male	Reference		Reference	
HLA mismatches				
4–6	2.02 (0.97 4.20)	0.060	2.41 (1.14 5.11)	0.021
0–3	Reference		Reference	
Baseline diagnosis				
Vascular	1.02 (0.50 2.07)	0.965		
DM	0.41 (0.19 0.89)	0.023	0.44 (0.20 0.96)	0.039
GN-vasculitis	1.01 (0.53 1.92)	0.983		
Interstitial NP	1.40 (0.57 3.41)	0.461		
Polycystic	1.34 (0.61 2.93)	0.471		

CI, confidence interval; DM, diabetes mellitus; GN, glomerulonephritis; HLA, human leukocyte antigen; NP, nephropathy; OR, odds ratio.

Anti-HLA and Anti-MICA Antibodies Screening and % PRA

Anti-HLA and anti-MICA antibodies were tested by multiplex microsphere-based flow cytometry (Luminex Technology, LABScreen Mixed kit, One Lambda, Canoga Park, CA). Microbeads were covered with the major HLA class I and II antigens and MICA antigens 001, 002, 004, 007, 009, 012, 017–019, and 027. The fluorescent signal for each coated bead was measured using LABScan 100 Flow Cytometry and analyzed by HLA-Visual software (One Lambda). The test was considered positive when the fluorescent signal of each bead was above the cutoff value provided by the manufacturer (anti-HLA class I and anti-MICA: standard fluorescence intensity >15,000; anti-HLA class II: standard fluorescence intensity >20,000).

Anti-HLA+ samples were incubated in a pooled lymphocyte panel prepared from at least 35 unrelated, nonselected genotypes and studied by CDC PRA). CDC test was performed with total peripheral blood lymphocytes and detected global anti-HLA antibodies, without differentiating between IgG and IgM isotypes. Result was considered positive when the amount of dead cells was equal or more than 40% of basal mortality.

Statistical Analysis

Descriptive data are presented as mean±standard deviation and their respective range. Categorical data are presented as absolute number and

proportion (%). Significance of differences was determined by Fisher's exact test or Pearson chi-square test when comparing frequencies and by Student's *t* test when comparing means. Survival analysis was performed according to the Kaplan–Meier method and compared among groups by log-rank analysis (global and pairwise comparisons were established). Binary logistic regression was applied in the univariate analysis to obtain the ORs for clinically relevant covariables previously studied by Kaplan–Meier ($P<0.1$). Variables with $P<0.1$ in the univariate analysis were introduced in the multivariate model to assess their independent effect. The software packages SPSS (version 18.0) and MedCalc (version 11.4.2.0) were used for statistical analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Julián Nevado and Elena Cano for their excellent technical assistance.

REFERENCES

- Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, et al. Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. *Am J Transplant* 2012; 12: 1618.
- Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280: 735.

3. Terasaki P. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003; 3: 665.
4. Zhang Q, Reed EF. Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 682.
5. Dragun D, Philippe A, Catar R. Role of non-HLA antibodies in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2012; 17: 440.
6. Win TS, Pettigrew GJ. Humoral autoimmunity and transplant vasculopathy: when allo is not enough. *Transplantation* 2010; 90: 113.
7. Zwirner NW, Fernandez-Vina MA, Stastny P. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 1998; 47: 139.
8. Zou Y, Mirbaha F, Lazaro A, et al. MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. *Hum Immunol* 2002; 63: 30.
9. Schrambach S, Ardizzone M, Leymarie V, et al. In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS ONE* 2007; 2: e518.
10. Zou Y, Bresnahan W, Taylor RT, et al. Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. *J Immunol* 2005; 174: 3098.
11. Caillat-Zucman S. How NKG2D ligands trigger autoimmunity? *Hum Immunol* 2006; 67: 204.
12. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, et al. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 6879.
13. Wei L, Lu J, Feng L, et al. Ischemia/reperfusion injury promotes MICA and MICB expression on human cardiac myocytes via HIF-1 pathway. *Am J Transplant* 2009; 576.
14. Luo L, Lu J, Wei L, et al. The role of HIF-1 in up-regulating MICA expression on human renal proximal tubular epithelial cells during hypoxia/reoxygenation. *BMC Cell Biol* 2010; 11: 91.
15. Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F, et al. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum Immunol* 2000; 61: 917.
16. Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE, Holgersson J, et al. Identification of the nonclassical HLA molecules, MICA, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 2002; 74: 268.
17. Zou Y, Stastny P, Susal C, et al. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med* 2007; 357: 1293.
18. Cox ST, Stephens HA, Fernando R, et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A allele mismatching, antibodies, and rejection in renal transplantation. *Hum Immunol* 2011; 72: 827.
19. Mizutani K, Terasaki P, Rosen A, et al. Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am J Transplant* 2005; 5: 2265.
20. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant* 2007; 7: 408.
21. Amezcua N, Crespo M, Lopez-Cobos M, et al. Relevance of MICA antibodies in acute humoral rejection in renal transplant patients. *Transpl Immunol* 2006; 17: 39.
22. Lemy A, Andrien M, Wissing KM, et al. Major histocompatibility complex class I chain-related antigen a antibodies: sensitizing events and impact on renal graft outcomes. *Transplantation* 2010; 90: 168.
23. Lemy A, Andrien M, Lionet A, et al. Posttransplant major histocompatibility complex class I chain-related gene A antibodies and long-term graft outcomes in a multicenter cohort of 779 kidney transplant recipients. *Transplantation* 2012; 93: 1258.
24. Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, et al. Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Hum Immunol* 2006; 67: 230.
25. Solgi G, Furst D, Mytilineos J, et al. Clinical relevance of pre and post-transplant immune markers in kidney allograft recipients: anti-HLA and MICA antibodies and serum levels of sCD30 and sMICA. *Transpl Immunol* 2012; 26: 81.
26. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, et al. Costimulation of CD8alpha/beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001; 2: 255.
27. Gratwohl V, Döhler R, Stern J, et al. H-Y as a minor histocompatibility antigen in kidney transplantation: a retrospective cohort study. *Lancet* 2008; 372: 49.

CAPÍTULO 2

Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement dependent cytotoxicity

Elena Sánchez-Zapardiel, María José Castro-Panete, Esther Mancebo, Pablo Morales, Rocío Laguna-Goya, José María Morales, Jacqueline Apaza, Amado de Andrés, Paloma Talayero, Estela Paz-Artal

Nephrology Dialysis Transplantation 2016; 31 (1): 150-160

	Página
Objetivos	88-89
Conclusiones	90-91
Publicación	92

OBJETIVOS

Como demostramos en nuestro anterior estudio, los anticuerpos anti-MICA preformados en receptores de un trasplante renal podrían tener un papel importante en la peor evolución de los injertos durante el periodo post-trasplante temprano, lo cual debe traducirse en una peor función renal durante ese tiempo. Conocer el modo en que los anticuerpos anti-MICA interaccionan con su diana antigénica y los mecanismos a través de los cuales pueden estar actuando contribuiría a una detección más eficaz y al mejor manejo de los pacientes trasplantados.

El principal mecanismo de actuación de los anticuerpos anti-HLA es la activación de la vía clásica del complemento, que también puede iniciarse por la presencia de anticuerpos anti-MICA. El estudio de las especificidades de los anticuerpos anti-MICA preformados aportaría información significativa acerca de los epítomos que se detectan de forma general y aquellos que son reconocidos con mayor frecuencia por los subtipos citotóxicos.

Bajo estas premisas y tomando como población inicial la misma cohorte de 727 receptores renales trasplantados entre los años 2005-2011 en el Hospital 12 de Octubre (Madrid), los objetivos planteados son:

1. Estudiar cómo influyen los anticuerpos anti-MICA pre-trasplante sobre el filtrado glomerular y el tiempo en alcanzar niveles óptimos de creatinina.
2. Definir de forma más exhaustiva los anticuerpos anti-MICA en aquellos receptores sensibilizados, analizando las distintas especificidades y su distribución en los dos

supereplets descritos (AYVE y CMGWS), tanto en presencia como ausencia de anticuerpos anti-HLA.

3. Demostrar la unión de estos anticuerpos al antígeno MICA en condiciones nativas sobre la superficie de células que lo expresan de forma constitutiva o inducida.

4. Analizar la capacidad de fijación de la región Fc de los anticuerpos anti-MICA preformados a la proteína C1q, iniciadora de la vía clásica del complemento.

5. Demostrar la activación de la citotoxicidad dependiente de complemento en el suero de receptores renales que presenten anticuerpos anti-MICA preformados.

CONCLUSIONES

1. Durante los tres primeros meses post-trasplante, los pacientes que presentan en suero anticuerpos anti-MICA preformados en coexistencia con anticuerpos anti-HLA tardan un mayor tiempo en alcanzar niveles óptimos de creatinina en sangre y su TFG es menor que en el resto. El estatus PRA+MICA+, además, se relaciona con mayor riesgo de ERC en estadio 5, cuya gravedad suele implicar la necesidad de regresar a diálisis y el retrasplante.
2. Los anticuerpos anti-MICA pre-trasplante son mayoritariamente poliespecíficos y muestran reacciones más fuertes cuando coexisten con anticuerpos anti-HLA. Los epítomos que éstos reconocen se pueden clasificar en dos supereplets, AYVE y CGMWS, y generalmente encontramos reacciones positivas en ambos. Los anticuerpos anti-MICA asociados con anticuerpos anti-HLA presentan reacciones más fuertes si reconocen el supereplet AYVE.
3. Los subtipos de anticuerpos anti-MICA preformados que son capaces de fijar C1q reconocen de forma característica un solo supereplet o ambos. Además, dentro de cada grupo, la poliespecificidad se reduce a una sola molécula MICA, que es la que presenta la reacción más fuerte. En el supereplet AYVE se trata de MICA*027 y en CMGWS de MICA*002.
4. Los anticuerpos anti-MICA presentes en el suero de pacientes antes de recibir un trasplante renal pueden reconocer la molécula MICA en condiciones nativas, expresada en las superficies celulares.

5. Los anticuerpos anti-MICA preformados tienen capacidad citotóxica, demostrada mediante técnicas de citotoxicidad dependiente de complemento similares a las empleadas en las pruebas cruzadas para detectar anticuerpos anti-HLA citotóxicos.

CAPÍTULO 2

PUBLICACIÓN

Original Articles

Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity

Elena Sánchez-Zapardiel¹, María José Castro-Panete¹, Esther Mancebo¹, Pablo Morales¹, Rocío Laguna-Goya^{1,2}, José María Morales^{2,3}, Jacqueline Apaza³, Amado de Andrés³, Paloma Talayero¹ and Estela Paz-Artal^{1,2,4,5}

¹Department of Immunology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, ²Research Institute I+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, ³Department of Nephrology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain, ⁴School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain and ⁵Section of Immunology, Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain

Correspondence and offprint requests to: Elena Sánchez-Zapardiel; E-mail: eszapardiel@gmail.com

ABSTRACT

Background. We previously reported that preformed anti-MHC class I-related chain A (MICA) antibodies increase the risk for renal graft rejection and enhance the deleterious effect of PRA⁺ status early after transplantation.

Methods. We studied 727 kidney recipients. Days to reach optimal serum creatinine level, estimated glomerular filtration rate (eGFR) at Month 3 and chronic kidney disease (CKD) stages were recorded. Anti-MICA specificities and C1q binding were tested by solid-phase assay. Complement-dependent cytotoxicity (CDC) and flow cytometry (FC) cross-matches with HeLa and PMA/CD28-T-blasts were performed.

Results. PRA⁺MICA⁺ recipients exhibited longer time to reach optimal serum creatinine level after transplantation ($P = 0.005$) and had the lowest eGFR at Month 3 ($P = 0.006$). PRA⁺MICA⁺ status independently increased the risk for CKDT stage 5 at Month 3 [hazard ratio (HR) 4.92, $P = 0.030$]. Pre-transplant anti-MICA antibodies were polyspecific and showed stronger reactions when coexisting with anti-HLA antibodies (mean standard fluorescent intensity $112\ 157 \pm 44\ 426$ in HLA⁺MICA⁺ sera versus $49\ 680 \pm 33\ 116$ in HLA⁺MICA⁻ sera, $P = 0.0006$). Anti-AYVE supereplet reactivity was significantly higher in HLA⁺MICA⁺ versus HLA⁺MICA⁻ patients ($P < 0.001$) and significantly superior than anti-CMGWS supereplet within HLA⁺MICA⁺ patients ($P = 0.001$). Three of 13 anti-MICA⁺ pre-transplant sera were positive for the

C1q binding assay; one of them (serum 3) exclusively recognized AYVE supereplet with a strong reactivity against MICA*027 antigen (same as MICA*008). Anti-MICA antibodies in anti-HLA-absorbed serum 3 bound native MICA molecules in MICA*008⁺ HeLa and PMA/CD28-T-blasts and mediated cell death by activating complement.

Conclusion. Preformed anti-MICA antibodies may occasionally be cytotoxic by fixing and activating complement. This way they might contribute to worse early kidney graft function.

Keywords: anti-MICA antibodies, cytotoxicity, pretransplantation, renal transplant

INTRODUCTION

The role of MHC class I-related chain A (MICA) polymorphic proteins in alloresponse has been increasingly recognized. MICA products are constitutively present in endothelial cells, and its expression increases in other renal compartments after stress accompanying transplantation [1]. MICA-driven deleterious immune response against grafts may be mediated by the activation of cytotoxic cells through engagement of NKG2D receptor [2]. Additionally, anti-MICA antibodies show the capacity to trigger complement-dependent or FcγR-dependent the cytotoxicity and/or the capacity to activate endothelia and promote thrombosis [3].

Zwirner *et al.* [4] found anti-MICA antibodies for the first time in sera of transplanted patients after rejection. Later studies showed a relationship between pre- or post-transplant anti-MICA antibodies and kidney allograft loss [5, 6], dysfunction and acute rejection [7]. Serial long-term follow-ups [8, 9] confirmed the harmful effect of anti-MICA antibodies by reporting an association with chronic graft failure. In an analysis of 727 kidney recipients, we obtained similar results. By categorizing transplanted patients either according to pre-transplant panel reactivity antibody (PRA) and anti-MICA sensitization status or to anti-HLA and anti-MICA sensitization status, we reported decreased graft survival in PRA⁺MICA⁺ patients and the highest risk for rejection at Month 3 in HLA⁺MICA⁺ patients [10].

Anti-MICA antibodies have been correlated with C4d-positive rejections [11, 12], and they have been shown to mediate complement-dependent cytotoxicity in kidney microvascular endothelial cells, HeLa or MICA-transfected cells [5, 13, 14]. However, lymphocytes do not express MICA, and cytotoxic anti-MICA antibodies cannot be detected by traditional complement-dependent cytotoxicity (CDC). This fact has made it difficult to systematically analyse the contribution of anti-MICA antibodies complement fixation capacity to graft deterioration.

Here, we further delineate the impact of preformed anti-MICA antibodies in kidney allograft function and analyse the anti-MICA specificities. We demonstrate that pre-transplant serum anti-MICA antibodies can bind native MICA molecules on cell membranes. By using both the C1q single-antigen beads assay and CDC, we show that these antibodies are able to mediate cell death by fixing and activating the complement cascade.

MATERIALS AND METHODS

Patients and samples

We retrospectively analysed 727 consecutive kidney allograft recipients transplanted between 2005 and 2011 in our hospital (cohort previously described [10]). The study was performed under informed consent and approved by the institutional review board (reference 10/014). Pre-transplantation sera were collected the day of transplantation. Allograft function was compared among patients categorized into four groups according to PRA status and flow cytometry (FC)-recorded anti-MICA antibodies: PRA⁺MICA⁺ ($n = 7$), PRA⁺MICA⁻ ($n = 610$), PRA⁻MICA⁻ ($n = 65$) and PRA⁻MICA⁺ ($n = 45$). Anti-MICA specificity and supereplet analysis was performed in MICA⁺ patients either with or without Luminex[®]-recorded anti-HLA antibodies: HLA⁺MICA⁺ ($n = 12$) and HLA⁻MICA⁺ ($n = 13$). A serum creatinine level ≤ 1.20 mg/dL for males and ≤ 0.90 mg/dL for females was considered optimal kidney function. We measured creatinine serum levels at Month 3 and calculated eGFR using the four-variable Modification of Diet in Renal Disease (MDRD-4) equation. Chronic kidney disease (CKD) stages were based on eGFR [15].

Anti-MICA-specific antibody and C1q binding assays

Anti-MICA-positive samples in the screening test [10] were tested by Luminex[®] for individual anti-MICA specificities

[Luminex single-antigen (LSA) assay, LABScreen MICA Single Antigen kit, One Lambda, Canoga Park, CA, USA]: 001, 002, 004, 007, 009, 012, 015, 017, 018, 019 or 027. C1q binding was tested in LSA-positive samples with the C1qScreen[™] kit. Both LSA and C1q binding were analysed by the Luminex platform LABScan 100 Flow Cytometry and HLA Fusion[™] software (One Lambda). A standard fluorescent intensity (SFI) $\geq 10\,000$ was considered positive. Some HLA⁺MICA⁺ sera were incubated with pools of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to remove anti-HLA specificities.

HLA and MICA genotyping

Blood donor DNA samples were typed by LABType[®] SSO HLA-A, HLA-B, HLA-DR and MICA and analysed by Luminex (One Lambda). HeLa HLA-A, -B and -C and blood donor HLA-C were analysed by PCR-SSO using INNO-LiPA kits and LiRAS[®] software (Innogenetics). Figure 1 shows a flow chart of main analysis in our population.

CD3⁺ T lymphocyte isolation, induction of MICA expression and FC

CD3⁺ T cells sorted from healthy donors' PBMCs (CD3 MicroBeads, MACS Miltenyi Biotec, San Diego, CA, USA) were resuspended in culture medium plus IL-2, PMA and anti-CD28 [16]. HeLa cells or PMA/CD28-T-blasts were incubated with MICA/B, isotype control and anti-HLA MoAbs (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). For cross-matches, cells were first incubated with anti-MICA-positive sera followed by anti-human IgG-FITC (MACS Miltenyi Biotec). FC was analysed using a Navios[™] Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA).

Complement-dependent cytotoxicity

PMA/CD28-T-blasts were incubated in Terasaki plates with recipient serum and goat anti-human IgG antiserum (AHG, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), followed by rabbit complement. After staining with 5 μ L of FluoroQuench[™] (One Lambda), cell mortality was examined by fluorescence microscopy.

Statistical analysis

Frequencies were compared by Fisher's or Pearson chi-square tests and means were analysed by Student's *t*-test or one-way ANOVA. Cox regression was performed in the univariate analysis to obtain the HR for clinically relevant covariables. Variables with a P-value < 0.100 were introduced in the multivariate model to assess their independent effect. P-values < 0.05 was considered significant. SPSS (version 18.0; IBM, Armonk, NY, USA) and MedCalc (version 11.4.2.0; MedCalc Software, Ostend, Belgium) were used for statistical analysis.

RESULTS

Pre-transplant PRA⁺MICA⁺ status is associated with decreased eGFR, longer time to reach optimal serum creatinine levels and the highest risk for CKD stage 5 in the early post-transplantation period

In the analysed cohort, anti-MICA-positive and -negative patient subgroups showed no statistically significant differences

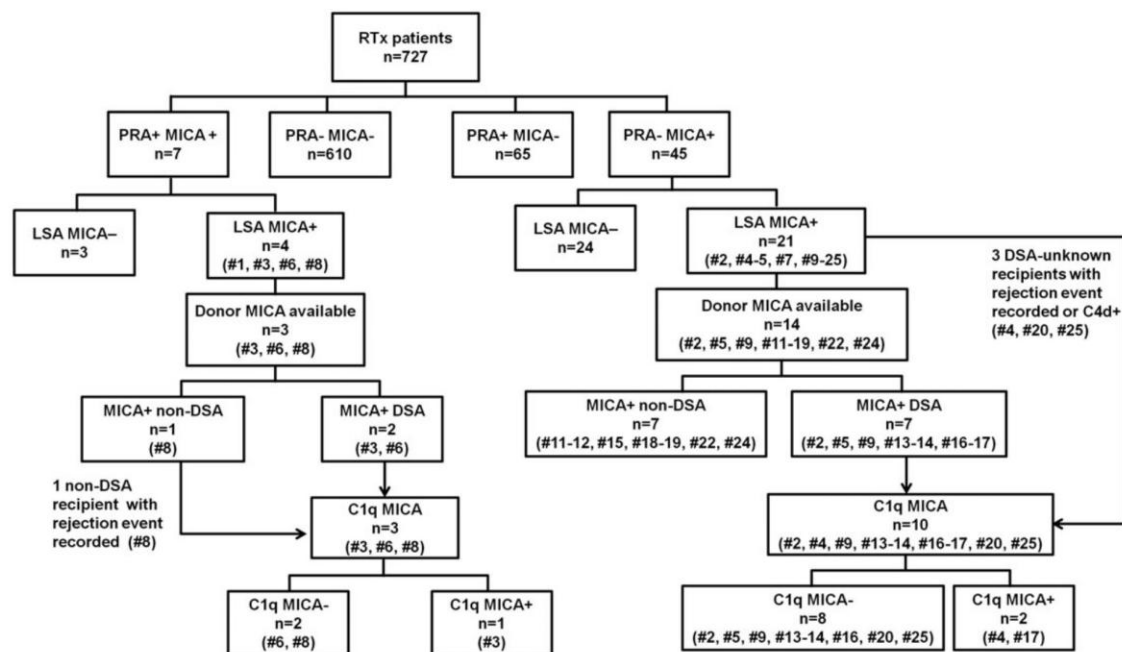


FIGURE 1: Flow diagram for the analysis of the renal transplanted (RTx) patient cohort ($n = 727$). First level shows the four main groups of patients classified according to PRA and MICA status. Levels 2–4 show the single-antigen (LSA MICA) and donor-specific antibody (DSA/non-DSA) analysis for MICA-positive recipients. The two final levels show C1q binding analysis (C1q MICA). In every square, positive sera for the corresponding test appear in brackets (see also Figure 3).

regarding sex and age of donor and recipient, donor type, immunosuppressive treatments and original disease [10].

We previously observed that pre-transplant PRA⁺MICA⁺ sensitization significantly decreased allograft survival and was associated with more biopsy-proven rejection [10]. To further analyse how preformed anti-MICA antibodies enhanced the deleterious effect of PRA⁺ status on allograft function, the number of days to reach optimal serum creatinine levels and eGFR at post-transplant Month 3 were compared among PRA⁺MICA⁺, PRA⁺MICA⁻, PRA⁻MICA⁺ and PRA⁻MICA⁻ patients. eGFR at Month 3 was significantly lower in recipients with both preformed anti-HLA and anti-MICA antibodies (PRA⁺MICA⁺ group) compared with the remaining groups (Figure 2A; PRA⁺MICA⁺ 38.23 ± 29.61 mL/min/1.73 m², PRA⁻MICA⁻ 50.63 ± 24.55 mL/min/1.73 m², PRA⁺MICA⁻ 59.02 ± 24.18 mL/min/1.73 m² and PRA⁻MICA⁺ 44.11 ± 19.26 mL/min/1.73 m²; $P = 0.006$). PRA⁺MICA⁺ recipients showed the longest time to reach an optimal creatinine level, followed by the PRA⁻MICA⁺ group, and global differences among groups were statistically significant (Figure 2B; PRA⁺MICA⁺ >90 days, PRA⁻MICA⁻ 72.37 ± 29.44 days, PRA⁺MICA⁻ 61.94 ± 35.68 days and PRA⁻MICA⁺ 79.47 ± 25.94 days; $P = 0.005$). Interestingly, the PRA⁺ groups were similar regarding the percentage of highly immunized (PRA >50%) patients and frequency of anti-HLA class I and/or class II antibodies as recorded by Luminex (no significant differences; Figure 2). However, we noticed that PRA⁺MICA⁻ patients showed the highest eGFR (Figure 2A) and reached optimal creatinine levels earlier than the remaining groups (Figure 2B). This could be explained by differences in immunosuppressive treatment since more PRA⁺MICA⁻ recipients

(91%) received induction therapy (with monoclonal antibody or thymoglobulin) compared with the other groups (86% in PRA⁺MICA⁺, 75% in PRA⁻MICA⁻ and 76% in PRA⁻MICA⁺; $P = 0.051$).

Finally, we analysed the relationship between PRA⁺MICA⁺ status and CKD stage 5 in the early post-transplantation period (CKD5T, very severely reduced kidney function, eGFR <15 mL/min/1.73 m² [15]), including other epidemiological and clinical variables (Table 1). Remarkably, coexistence of anti-HLA and anti-MICA antibodies emerged as an independent risk factor for CKD5T compared with PRA⁻MICA⁻ (HR 4.92, $P = 0.030$) in the multivariate analysis. Donor age (71–85 years) was also independently associated with a higher risk for CKD5T (HR 3.34, $P = 0.028$).

Preformed anti-MICA antibodies are polyspecific and show stronger reactions when coexisting with anti-HLA antibodies

Among our pre-transplant anti-MICA-sensitized recipients ($n = 52$), 48% showed a positive anti-MICA single-antigen study ($n = 25$). Anti-HLA were present together with anti-MICA antibodies in 12 of these patients (HLA⁺MICA⁺) whereas 13 subjects had isolated anti-MICA antibodies (HLA⁻MICA⁺). Preformed anti-MICA antibodies were mostly polyspecific, with a mean of five different specificities per serum in both groups (Figure 3A). Antibodies against MICA*001 were the most frequent, followed by anti-MICA*018 (64 and 60% of patients, respectively). Those specificities were more prevalent in patients without HLA immunization versus double-immunized patients (69 versus 58% and 69 versus 50%, respectively). Among

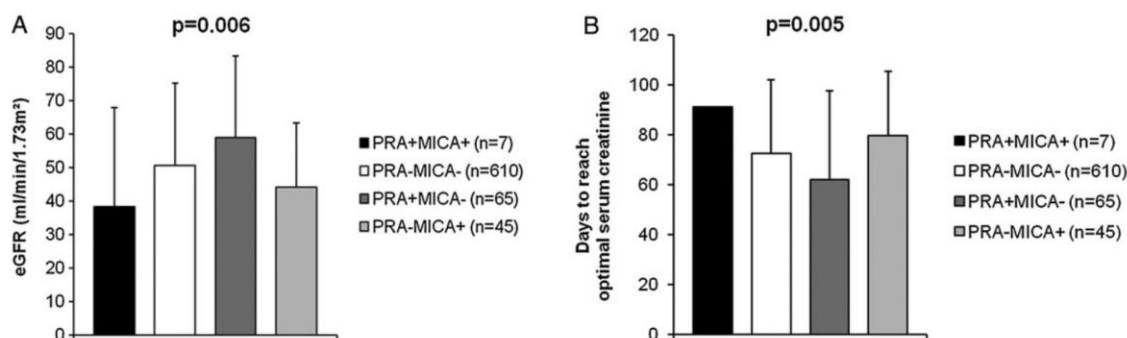


FIGURE 2: Effect of pre-transplant PRA and anti-MICA status on renal graft function parameters. (A) Estimated glomerular filtration rate (eGFR) at post-transplantation Month 3. (B) Days to reach optimal serum creatinine levels. Time to reach optimal creatinine level in PRA⁺MICA⁺ group is superior to 90 days in all patients included (91 ± 0 days). PRA status was similar between PRA⁺ groups regarding (1) highly immunized (PRA >50%) patients: 10% in PRA⁺MICA⁻ versus 14% in PRA⁺MICA⁺ (P = 0.747); (2) anti-HLA class I antibodies, 71% in PRA⁺MICA⁻ versus 100% in PRA⁺MICA⁺, P = 0.542; (3) anti-HLA class II antibodies, 49% in PRA⁺MICA⁻ versus 71% in PRA⁺MICA⁺, P = 0.724 and (4) both anti-HLA class I and II antibodies, 46% in PRA⁺MICA⁻ versus 71% in PRA⁺MICA⁺, P = 0.390.

Table 1. Univariate and multivariate analysis by Cox regression for CKD5T at Month 3 in patients categorized by PRA and anti-MICA antibodies^a

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	HR	95% CI	P-value	HR	95% CI	P-value
CKD5T (n = 57)						
Preformed serum antibodies						
PRA ⁺ MICA ⁺	3.51	0.85–14.48	0.083	4.92	1.17–20.73	0.030
PRA ⁺ MICA ⁻	0.18	0.02–1.33	0.093	0.25	0.03–1.79	0.166
PRA ⁻ MICA ⁺	1.25	0.50–3.15	0.632	1.25	0.50–3.16	0.632
PRA ⁻ MICA ⁻	Reference			Reference		
Donor sex						
Female	1.36	0.80–2.30	0.261			
Male	Reference					
Recipient age, years						
36–70	1.84	0.65–5.15	0.250	1.11	0.37–3.31	0.855
71–84	3.15	1.05–9.41	0.041	0.96	0.26–3.58	0.952
0–35	Reference			Reference		
Donor age, years						
36–70	1.87	0.78–4.53	0.163	1.79	0.71–4.48	0.217
71–85	3.95	1.50–9.75	0.003	3.34	1.14–9.80	0.028
0–35	Reference			Reference		
Induction therapy						
Tg	1.62	0.75–3.49	0.217			
mAb	1.13	0.52–2.45	0.752			
No induction therapy	Reference					
HLA mismatches						
4–6	2.26	1.10–4.61	0.026	2.02	0.98–4.16	0.056
0–3	Reference			Reference		
Baseline diagnosis						
Vascular	1.99	1.11–3.55	0.020	1.55	0.83–2.89	0.165
DM	0.95	0.53–1.71	0.860			
GN-vasculitis	0.67	0.33–1.36	0.665			
Interstitial NP	0.71	0.22–2.28	0.565			
Polycystic	0.85	0.40–1.80	0.672			

CKD5T, chronic kidney disease stage 5 for transplantation; Tg, thymoglobulin; mAb, monoclonal antibodies (basiliximab); PRA, panel reactive antibody; OR, odds ratio; CI, confidence interval; DM, diabetes mellitus; GN, glomerulonephritis; NP, nephropathy.

^aUnivariate analysis by Cox regression for transplant number, cold ischaemia time, recipient weight, recipient sex and donor category showed P-values >0.100 and are not included in the table.

HLA⁺MICA⁺ recipients, anti-MICA*017 antibodies were the most prevalent and more frequent than in the HLA⁻MICA⁺ group (75 versus 38%). Interestingly, preformed anti-MICA

antibodies were stronger when coexisting with anti-HLA antibodies (Figure 3B; mean SFI 112 157 ± 44 426 in HLA⁺MICA⁺ versus 49 680 ± 33 116 in HLA⁻MICA⁺ sera, P = 0.0006).

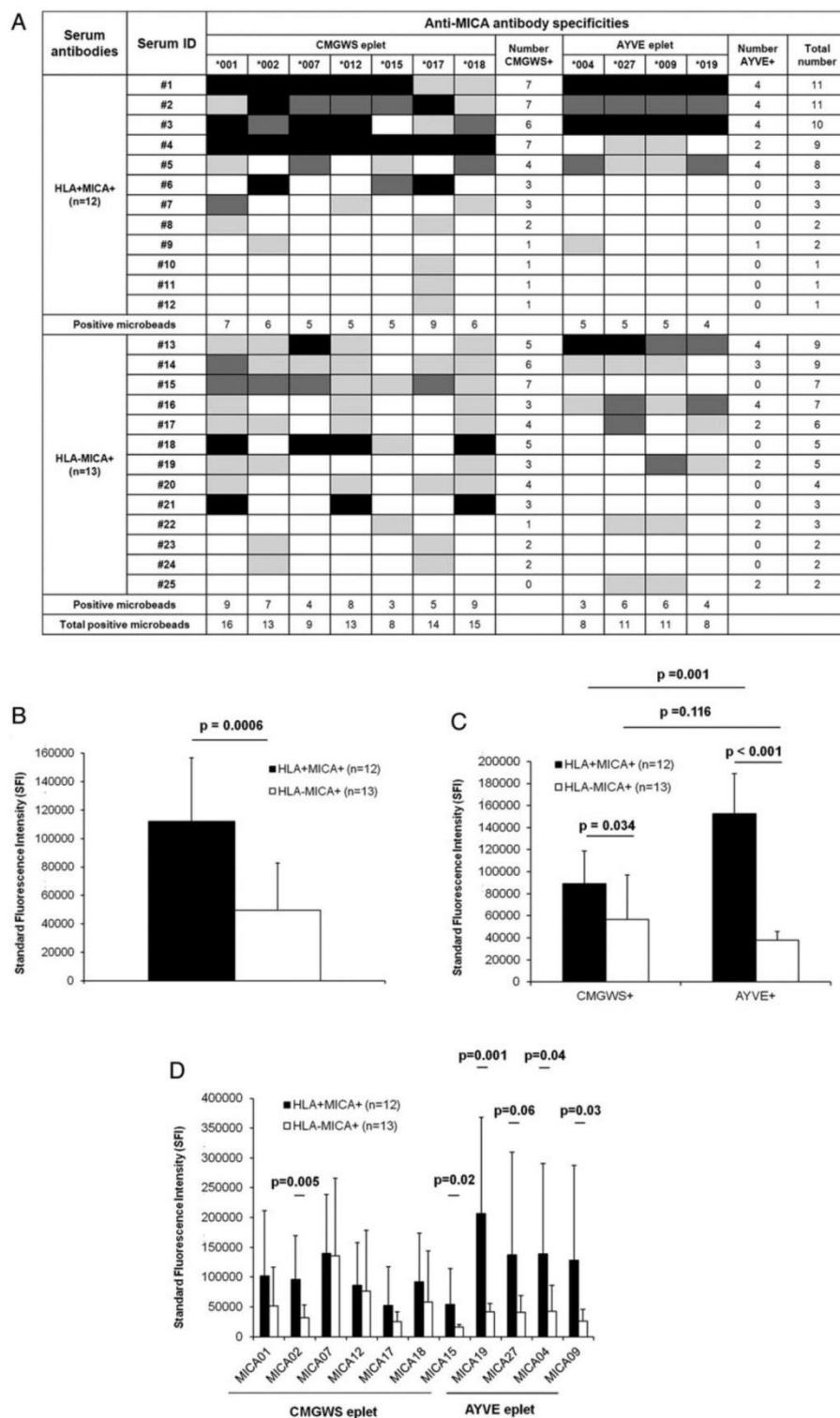


FIGURE 3: Preformed anti-MICA antibody specificities in HLA⁺MICA⁺ ($n = 12$) or HLA⁻MICA⁺ ($n = 13$) kidney transplant recipients. **(A)** Colour code shows the strength of the reaction for each specific antibody: black squares = strong reaction (SFI >80 000); dark grey squares = intermediate reaction (SFI 40 000–80 000); light grey squares = weak reaction (SFI 10 000–40 000). **(B)** Comparison of preformed anti-MICA antibody SFI between HLA⁺MICA⁺ and HLA⁻MICA⁺ groups. **(C)** Comparison of preformed anti-MICA antibody SFI for CMGWS and AYVE supereplets between HLA⁺MICA⁺ and HLA⁻MICA⁺ patients. **(D)** Comparison of preformed anti-MICA antibody SFI between HLA⁺MICA⁺ and HLA⁻MICA⁺ groups for each specificity within CMGWS and AYVE supereplets.

After transplantation, the MICA genotype was available in 17 donors. Preformed anti-MICA antibodies were donor specific in nine patients (anti-MICA DSA, sera 2, 3, 5, 6, 9, 13, 14, 16 and 17) and non-donor-specific in eight patients (anti-MICA non-DSA, sera 8, 11, 12, 15, 18, 19, 22 and 24) (Figure 3A). We did not find significant differences in either eGFR at Month 3 post-transplantation (51.09 ± 23.02 mL/min/1.73 m² in anti-MICA DSA versus 42.14 ± 19.99 mL/min/1.73 m² in anti-MICA non-DSA, $P = 0.409$) or days to reach optimal creatinine (79.67 ± 23.04 in DSA versus 80.13 ± 22.43 in non-DSA, $P = 0.967$); however, more patients with anti-MICA DSA also had anti-HLA antibodies versus patients with anti-MICA non-DSA (55 versus 38%, respectively).

Supereplet profile of preformed anti-MICA antibodies

Duquesnoy *et al.* [17] classified a total of 11 anti-MICA specificities into two reaction groups by developing an eplet-based version of the HLA-Matchmaker algorithm: CMGWS supereplet included anti-MICA*001, *002, *007, *012, *015, *017 and *018 specificities and AYVE supereplet contained anti-MICA*004, *009, *019 and *027 specificities (this last one showing the same amino acid sequence in the extracellular domain as MICA*008) [18]. Among our MICA⁺ patients, 52% had anti-MICA specificities that included both CMGWS and AYVE supereplets (Figure 3A). All HLA⁺MICA⁺ patients ($n = 12$) had specificities directed against CMGWS, but only half had specificities against both CMGWS and AYVE supereplets. Twelve of 13 HLA⁺MICA⁺ patients had anti-CMGWS reactivity, and 6 of them also had anti-AYVE reactivity. Only one HLA⁺MICA⁺ recipient showed exclusive immunization against AYVE (serum 25).

However, mean antibody levels were higher against AYVE supereplet, and AYVE reactivity was significantly higher in HLA⁺MICA⁺ versus HLA⁺MICA⁺ individuals (SFI $152\,773 \pm 36\,177$ versus $37\,783 \pm 7866$, $P < 0.001$) and significantly superior than reactivities against CMGWS within HLA⁺MICA⁺ patients (SFI $152\,773 \pm 36\,177$ versus $88\,497 \pm 30\,112$, $P = 0.001$). Antibodies against CMGWS were significantly more intense in HLA⁺MICA⁺ than those in HLA⁺MICA⁺ patients (SFI $88\,497 \pm 30\,112$ versus $56\,479 \pm 40\,602$, $P = 0.034$), whereas within HLA⁺MICA⁺ group, the intensity of anti-CMGWS or anti-AYVE antibodies was not significantly different (SFI $56\,479 \pm 40\,602$ versus $37\,783 \pm 7866$, $P = 0.116$) (Figure 3C). Finally, every individual AYVE supereplet specificity reacted with significantly more intensity in HLA⁺MICA⁺ than that in HLA⁺MICA⁺ patients (Figure 3D). Regarding CMGWS supereplet, only anti-MICA*002 and anti-MICA*015 antibodies were significantly more intense in double-immunized versus HLA⁺MICA⁺ patients ($P = 0.005$ and $P = 0.020$, respectively).

Preformed anti-MICA antibodies may bind native MICA antigens on cell surfaces

We tested by FC if anti-MICA antibodies were able to bind MICA antigens on cell surfaces in addition to binding MICA molecules captured on microbeads, which may show conformational differences versus native MICA. Two MICA*008 homozygous cells were chosen (Hela and PMA/CD28-T-cell blasts) to improve the sensitivity of the binding assay, since

MICA*008-positive cells express 7- to 10-fold higher levels of MICA proteins at the cell surface [19]. Reactions due to the presence of anti-HLA antibodies were avoided by performing FC with six anti-MICA*027/*008-positive pre-transplantation sera samples from HLA⁺MICA⁺ recipients (anti-MICA*027 SFI: serum 13: 87 878; 14: 33 603; 16: 42 118; 17: 53 771; 22: 14 143; 25: 13 622). All these FC binding tests were negative with HeLa and PMA/CD28-T-cells.

Because we observed that anti-MICA antibodies accompanied by anti-HLA antibodies showed stronger reactions, we selected two pre-transplant sera from the HLA⁺MICA⁺ group with anti-MICA antibody screening $>150\,000$ SFI (sera 3 and 4) to test their binding capacity to MICA native proteins. The anti-MICA*027/*008 reaction was strong for serum 3 (SFI 120 604) and weak for serum 4 (SFI 30 348). After absorption with lymphocyte pools, an intense decrease of most anti-HLA antibodies in both sera 3 and 4 was observed. Anti-HLA specificities corresponding to HeLa HLA-A68, -B72 and -Cw12 and to T blasts HLA-A3, -A11, -B27, -B52, -Cw7 and -Cw14 were virtually absent (Figure 4A and B). FC showed that HeLa cells constitutively express MICA antigens, in a similar amount to HLA class I expression (Figure 4C and D), whereas CD3⁺ T cells present HLA class I but not MICA proteins on their surface. Nevertheless, mitogen stimulation of CD3⁺ T cells increased membrane HLA class I and induced the surface expression of MICA (Figure 4E and F). FC-recorded binding for absorbed serum 3 was clearly positive with HeLa and slightly positive for T blasts (Figure 4G and H), but absorbed serum 4 binding was negative with both cell lines (Figure 4I and J), consistent with the higher anti-MICA*027/*008 SFI in sample 3. Superior constitutive MICA antigen density on HeLa cell membranes (98% MICA-positive cells, MFI: 7.35, Figure 4D) versus induced MICA antigen in PMA/CD28-T-blasts (85% MICA-positive cells, MFI: 3.91, Figure 4F) may explain differences in binding intensity of serum 3 between both cell lines and indicates that FC with HeLa cells is probably a more sensitive assay for the detection of specific anti-MICA*027 antibodies. HLA-absorbed serum 3 contained a small amount of anti-HLA-DRB1*13 antibodies (SFI 41 142) that bind neither HeLa cells, due to the lack of HLA class II on their membranes, nor T blasts, which expressed HLA-DR1 and -DR15 after PMA/CD28 activation. Thus we conclude that preformed anti-MICA antibodies may bind native MICA proteins on cells membranes.

Preformed anti-MICA antibodies bind C1q and activate CDC

The C1q Luminex assay uses microbeads exclusively covered by individual MICA antigens. We studied 13 positive anti-MICA single-antigen pre-transplant samples, all 9 anti-MICA DSA sera (2, 3, 5, 6, 9, 13, 14, 16 and 17; Figure 3A) plus 4 samples from anti-MICA non-DSA recipients with a rejection event recorded and/or C4d⁺ kidney biopsy (sera 4, 8, 20 and 25; Figure 3A). Among the 13 sera, 10 were anti-MICA specific C1q negative (SFI values between 0 and 143) and 3 (23%) had C1q-fixing anti-MICA antibodies (SFI serum 3: 355 550; serum 4: 69 631; serum 17: 45 578). Interestingly, whereas anti-MICA antibodies were polyspecific in all three sera and recognized MICA antigens included in both CMGWS and AYVE

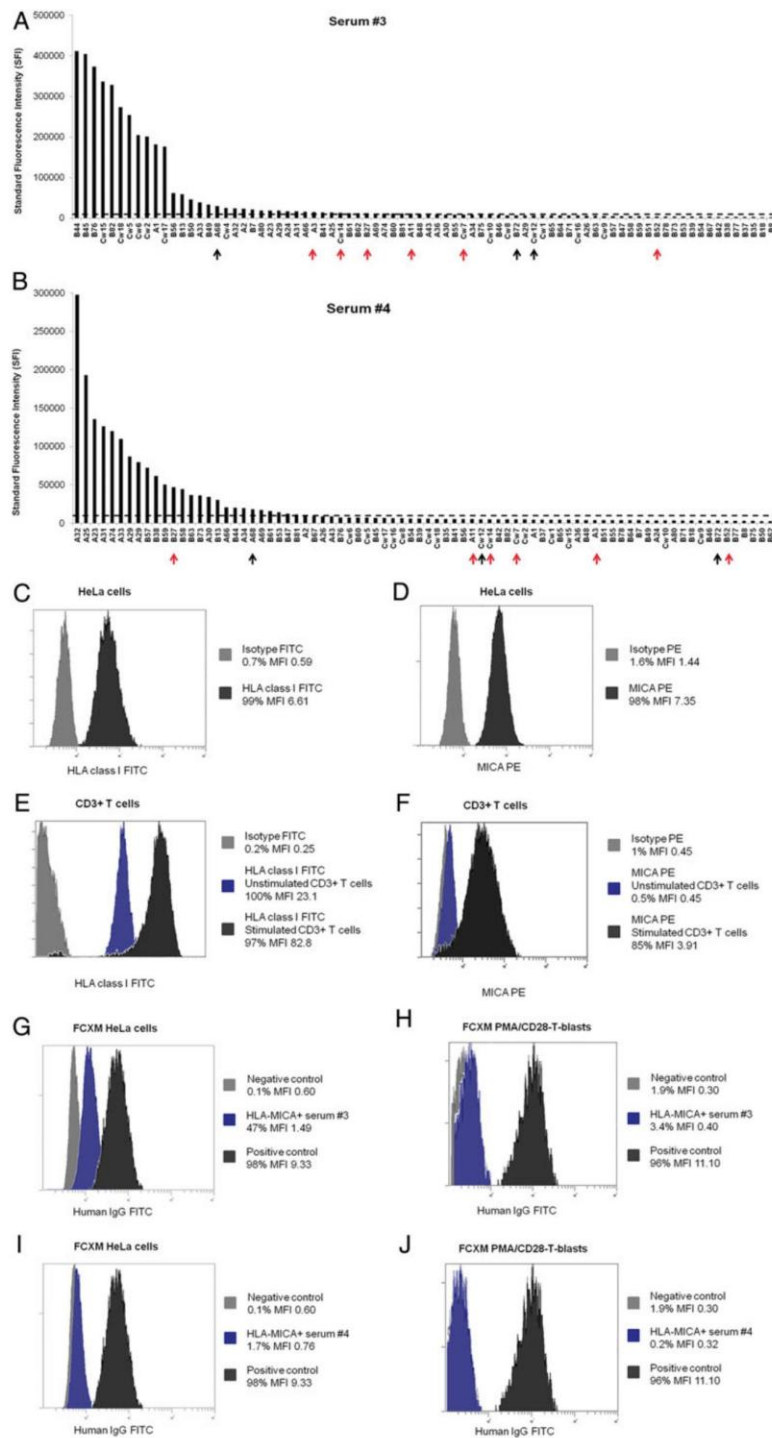


FIGURE 4: Single-antigen specificities and flow cytometry cross-match (FCXM) analysis of serum 3 and serum 4. Amount of antibodies against HLA class I antigens of HeLa cells (black arrows, HeLa cells HLA typing: A*68:02,-/B*15:03,-/Cw*12:03,-/MICA*008:01/04,-) and PMA/CD28-T-cell blasts (red arrows, T-cell blasts HLA typing: A*3,*11/B*27,*52/Cw*7,*14/DRB1*01,*15/MICA*008:01,-) in (A) serum 3 and (B) serum 4 (B), after antibody absorption treatment. FC-recorded expression of HLA class I and MICA antigens on HeLa cells (C and D, respectively) and mitogen-stimulated T cells (E and F, respectively). (G) Absorbed serum 3 binding by FCXM was clearly positive with HeLa cells and (H) slightly positive with T-cell blasts. (I) Absorbed serum 4 binding was negative for HeLa cells as well as for (J) T-cell blasts. Negative control (light grey histogram) consisted of cells incubated with a serum without antibodies and positive control (black histogram) consisted of cells incubated with a pooled serum from three hyperimmunized patients with >50% PRA.

supereplets (Figure 5A, C and E), C1q-fixing anti-MICA antibodies were exclusively directed against AYVE in serum 3, CMGWS in serum 4 and against both supereplets in serum

17 (Figure 5B, D and F). The highest C1q-positive anti-MICA reactivity corresponded to MICA*027/*008 in serum 3 (SFI 355 550). Sample 3 then exemplifies that pre-transplant anti-MICA

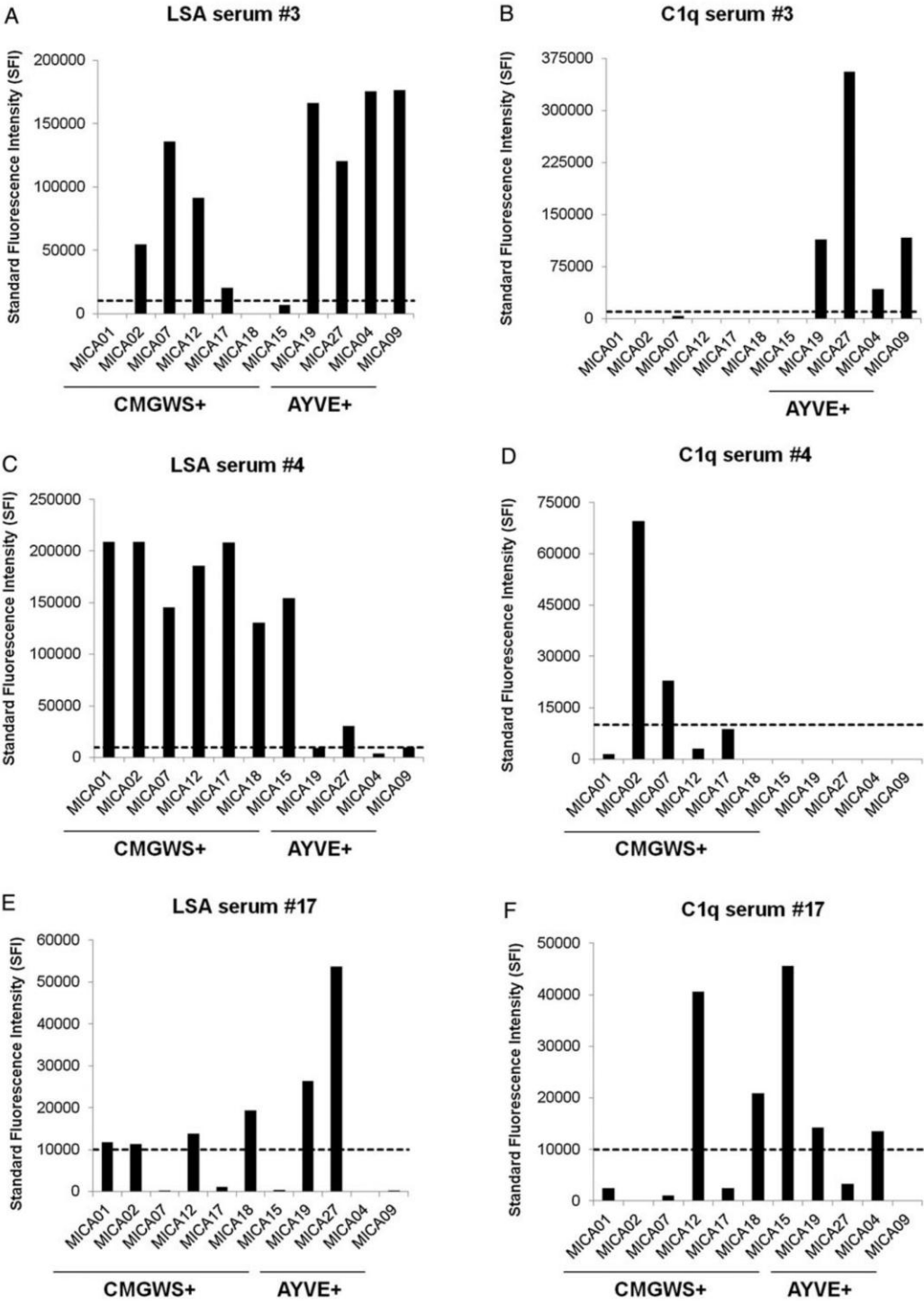


FIGURE 5: Global preformed anti-MICA single-antigen specificities and C1q binding anti-MICA specificities categorized according to CMGWS and AYVE supereplets. (A) Serum 3 had anti-CMGWS and anti-AYVE antibodies but (B) only anti-AYVE ones bind C1q. (C) Serum 4 had anti-CMGWS and anti-AYVE antibodies but (D) only anti-CMGWS ones bind C1q. (E) Serum 17 had both supereplet reactivities and (F) both anti-CMGWS and anti-AYVE bind C1q.

antibodies are able to recognize membrane MICA antigens and to fix C1q.

Finally, we analysed the absorbed serum 3 in a modified CDC-AHG assay. Whereas all PMA/CD28-T-cell blasts incubated with negative control plus complement remained alive and all cells died when incubated with positive control plus complement, ~60–80% of cells died after incubation with serum 3 and complement (Figure 6A–C). We conclude that preformed anti-MICA antibodies in the serum of transplant recipients are able to bind native MICA antigens on cell surfaces and activate classical complement cascade leading to target-cell death.

DISCUSSION

We previously reported that preformed anti-MICA antibodies increase the risk for rejection and enhance the deleterious effect of PRA⁺ status in the early post-transplantation period [10]. Here we provide further evidence that preformed anti-MICA antibodies deteriorate renal graft function after transplantation by showing that the time to reach optimal serum creatinine level after transplantation is longer for patients with pre-transplant anti-HLA and anti-MICA antibodies and, 3 months post-transplant, eGFR is the lowest in these patients. PRA⁺MICA⁺ recipients showed the highest risk for CKD5T, which frequently involves retransplantation. Nevertheless, a limitation of our work exists, since results explaining the main and synergistic effects of anti-MICA antibodies are not fully consistent and partially depend on observations from a small cohort of patients (PRA⁺MICA⁺). In our series, PRA⁺ status included both anti-HLA DSA and non-DSA. Although anti-HLA DSA have the greatest impact on allograft evolution [20, 21], a deleterious effect of anti-HLA non-DSA has also been reported [22–24]. Finally, systematic follow-up biopsies in patients with anti-MICA antibodies would help to further understand their potential role in worsening graft function.

From our initial cohort of 52 anti-MICA-sensitized patients as shown by the screening Luminex assay, 25 sera remained positive when analysed by the anti-MICA LSA. This reduction could be related to low strength of preformed anti-MICA antibodies together with bead-dependent dilutional effects (2 groups of beads bearing MICA antigens in the screening versus 11 groups in LSA) [25]. All recorded specificities corresponded to either one or both CMGWS and AYVE MICA [17, 18]. A higher frequency of preformed anti-MICA antibodies directed against anti-CMGWS than anti-AYVE supereplet was observed, and in particular against antigens MICA*001, *018 and *017. These specificities are also more prevalent in patients after kidney transplantation [18]. However, MICA*001, *018 and *017 are not the most frequent MICA antigens in Spanish or other related Caucasian populations, where MICA*008 (25% in Spanish population, included in AYVE supereplet), followed by *002, *004, *001, *009, *016 and *010, are mainly found [26–28]. Consequently the most frequent sensitizing events correspond to subjects bearing AYVE MICA antigens exposed to CMGWS alloantigens.

We observed that preformed anti-MICA antibodies are more intense when accompanied by anti-HLA antibodies, and this was especially noticed for anti-AYVE antibodies recognizing the

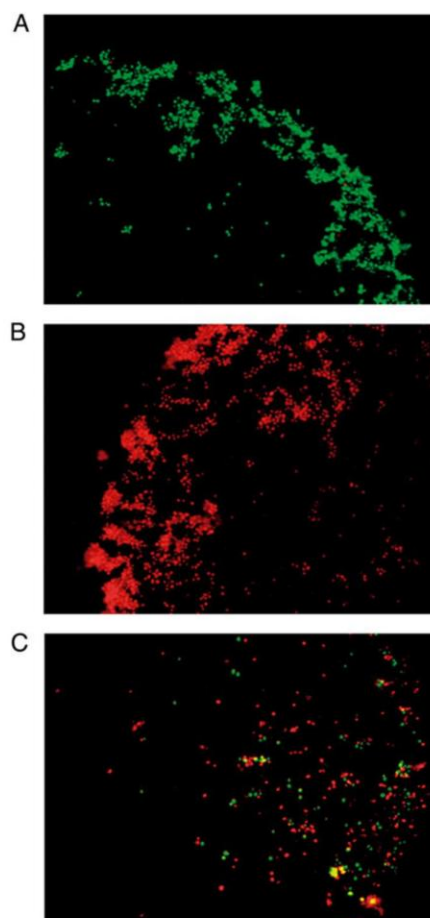


FIGURE 6: CDC-AHG for serum 3 with MICA*008-positive T-cell blasts. (A) Cells remain alive when incubated with negative control (HLA[−]MICA[−] serum) plus complement. (B) Cells die when incubated with positive control (pool of three sera with anti-HLA antibodies from three hyperimmunized patients >50% PRA) plus complement. (C) Incubation of T blasts with absorbed serum 3 plus complement is cytotoxic for ~60–80% of cells.

most prevalent antigen MICA*027/*008. This suggests that the generation of anti-MICA*027/*008 antibodies corresponds mainly to an anti-allogeneic humoral immune response. These results support data from the study by Tonnerre *et al.* who observed that MICA*008 protein expresses 7- to 10-fold higher levels at the endothelial cell surface and is the preferential antigen leading to anti-MICA sensitization after renal transplantation in MICA-mismatched donor/recipient pairs [19].

By using the C1q Luminex assay, we show for the first time that some preformed anti-MICA antibodies may bind complement. From an analysis of 13 pre-transplant sera, 3 were C1q-positive: sera 3 and 4 corresponded to third kidney recipients and serum 17 corresponded to a female with past pregnancies. This further supports the existence of an allogeneic response against MICA antigens. This low proportion is in contrast with data from post-transplant anti-MICA antibodies that showed 8 C1q-positive out of 10 analysed sera (unpublished data). It is possible that complement-binding IgG1, IgG3 and IgM may

principally arise after transplantation, whereas pre-transplant antibodies may correspond to non-complement-binding subclasses. However, we noticed that anti-MICA antibody SFI was superior in post- versus pre-transplant samples, supporting the notion that positivity in the C1q Luminex assay is more frequent in sera with higher antibody titres [29, 30]. Interestingly, we observed that the highest C1q-positive SFI corresponded to anti-MICA*008, further supporting the immunogenicity of MICA*008 antigen and its role in the alloimmune response.

The capacity of anti-MICA antibodies to bind MICA antigens and trigger cell death in the presence of complement has been observed in the past. However, our data include two main novelties. First, we provide evidence that complement-mediated cell death is a capacity of anti-MICA antibodies existing in the serum of patients before transplantation, whereas previous authors have demonstrated the complement-mediated cytotoxicity capacity for post-transplant anti-MICA antibodies from patients rejecting kidney [5, 13] or heart [14] grafts or for anti-MICA*008 monoclonal antibodies generated in mice [13]. Second, we demonstrate cell death in CDC assays by incubating pre-transplant serum with mitogen-stimulated MICA-expressing T cells instead of the MICA-transfected or endothelial cell lines used in previous works. In our hands, contrary to data from Zou *et al.* [13], CDC was negative with HeLa cells, maybe because the anti-MICA antibody titre in pre-transplant serum was not high enough to overcome protection from death mediated by membrane-bound complement regulators. Interestingly, CDC-positive serum 3 corresponded to an anti-MICA DSA-positive patient with suspected acute rejection, who responded to treatment with steroids. Studies are needed to understand the significance of positive MICA cross-matches in the clinical setting.

CONCLUSION

In conclusion, we demonstrate that complement-mediated cytotoxicity is a property of some preformed anti-MICA antibodies. This capacity may play a role in deterioration of the renal allograft function early after transplantation in pre-transplant anti MICA-sensitized recipients. The relative contribution of this mechanism to renal graft dysfunction, compared with others such as NKG2D-mediated activation of NK cells by MICA-expressing renal grafts, cannot be definitively established yet. MICA-specific cross-matching and CDC tests with higher sensitivity may help to answer this question.

FUNDING

This work was supported by FIS, Instituto de Salud Carlos III, Proyecto Integrado 2013/00045, Spain (partially financed by the European Regional Development Fund).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The results presented in this paper have not been published previously in whole or part, except in abstract format. The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Luo L, Lu J, Wei L *et al.* The role of HIF-1 in up-regulating MICA expression on human renal proximal tubular epithelial cells during hypoxia/reoxygenation. *BMC Cell Biol* 2010; 11: 91
2. Bauer S, Groh V, Wu J *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285: 727–799
3. Zwirner NW, Fuertes MB, Girart MV *et al.* Immunobiology of the human MHC class I chain-related gene A (MICA): from transplantation immunology to tumor immune escape. *Inmunología* 2006; 25: 25–38
4. Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F *et al.* Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum Immunol* 2000; 61: 917–924
5. Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE, Holgersson J *et al.* Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 2002; 74: 268–277
6. Zou Y, Stastny P, Susal C *et al.* Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med* 2007; 357: 1293–1300
7. Cox ST, Stephens HA, Fernando R *et al.* Major histocompatibility complex class I-related chain A allele mismatching, antibodies, and rejection in renal transplantation. *Hum Immunol* 2011; 72: 827–834
8. Mizutani K, Terasaki P, Rosen A *et al.* Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am J Transplant* 2005; 5: 2265–2272
9. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant* 2007; 7: 408–415
10. Sanchez-Zapardiel E, Castro-Panete MJ, Castillo-Rama M *et al.* Harmful effect of preformed anti-MICA antibodies on renal allograft evolution in early posttransplantation period. *Transplantation* 2013; 96: 70–78
11. Alvarez-Marquez A, Aguilera I, Gentil MA *et al.* Donor-specific antibodies against HLA, MICA, and GSTT1 in patients with allograft rejection and C4d deposition in renal biopsies. *Transplantation* 2009; 87: 94–99
12. Li L, Chen A, Chaudhuri A *et al.* Compartmental localization and clinical relevance of MICA antibodies after renal transplantation. *Transplantation* 2010; 89: 312–319
13. Zou Y, Mirbaha F, Lazaro A *et al.* MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. *Hum Immunol* 2002; 63: 30–39
14. Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Gonzalez MZ *et al.* The relationship of anti-MICA antibodies and MICA expression with heart allograft rejection. *Am J Transplant* 2007; 7: 1842–1848
15. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39 (2 Suppl 1): S1–266
16. Molinero LL, Fuertes MB, Rabinovich GA *et al.* Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 791–797
17. Duquesnoy RJ, Mosteck J, Hariharan J *et al.* Structurally based epitope analysis of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) antibody specificity patterns. *Hum Immunol* 2008; 69: 826–832
18. Suarez-Alvarez B, Alonso-Arias R, Bravo-Mendoza C *et al.* Identification of epitopes and immunodominant regions on the MICA protein defined by alloantibodies from kidney transplant patients. *Transplantation* 2009; 88: S68–S77
19. Tonnerre P, Gerard N, Chatelais M *et al.* MICA variant promotes allosensitization after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24: 954–966
20. Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8: 348–357
21. Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS *et al.* Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1398–1406
22. Opelz G. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet* 2005; 365: 1570–1576
23. Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI *et al.* Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 2804–2812

24. Ozawa M, Rebellato LM, Terasaki PI *et al.* Longitudinal testing of 266 renal allograft patients for HLA and MICA antibodies: Greenville experience. In: Terasaki PI (ed). *Clinical Transplants 2006*. Los Angeles: Terasaki Foundation Lab, 2007, pp. 265–290
25. Gebel HM, Liwski RS, Bray RA. Technical aspects of HLA antibody testing. *Curr Opin Organ Transplant* 2013; 18: 455–462
26. Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM *et al.* Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics* 1999; 49: 605–612
27. Lucas D, Campillo JA, Lopez-Hernandez R *et al.* Allelic diversity of MICA gene and MICA/HLA-B haplotypic variation in a population of the Murcia region in southeastern Spain. *Hum Immunol* 2008; 69: 655–660
28. Zhang Y, Lazaro AM, Lavingia B *et al.* Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum Immunol* 2001; 62: 620–631
29. Crespo M, Torio A, Mas V *et al.* Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: does C1q-fixation matter? *Transpl Immunol* 2013; 29: 28–33
30. Tinckam KJ, Heeger PS. Transplantation: complementing donor-specific antibody testing. *Nat Rev Nephrol* 2013; 9: 713–714

Received for publication: 15.3.2015; Accepted in revised form: 22.7.2015

CAPÍTULO 3

Isolated *de novo* anti-endothelial cell antibodies and kidney transplant rejection

Elena Sánchez-Zapardiel, Esther Mancebo, María Díaz-Ordoñez, Lucía Jorge-Huertas, Lara Ruiz-Martínez, Antonio Serrano, María J. Castro-Panete, Pablo Morales, Amado Andrés, José M. Morales, Sara Domínguez-Rodríguez, Estela Paz-Artal

American Journal of Kidney Diseases 2016; doi: 10.1053/j.ajkd.2016.07.019

	Página
Objetivos	105-106
Conclusiones	107
Publicación	108

OBJETIVOS

El endotelio constituye la primera barrera entre el sistema inmunológico del receptor y las células del donante, por lo que es importante conocer los mecanismos a través de los cuales se produce el daño endotelial, así como los biomarcadores que nos permiten detectarlo.

Los AECA han sido previamente relacionados con el desarrollo de ciertas enfermedades autoinmunes, inflamación, procesos infecciosos y alorespuestas humorales. Se trata de un grupo heterogéneo de inmunoglobulinas que reconocen distintas dianas y que podrían tener un papel en la respuesta humoral durante el rechazo de los trasplantes de órganos sólidos. En estudios previos se ha demostrado esta relación, si bien en las cohortes seleccionadas no se descarta la posibilidad de que sean marcadores de daño endotelial, y no causa directa de éste.

Para su detección en laboratorio, es necesario que la metodología sea sencilla y asequible. La principal limitación del estudio de AECA es que todavía no se han descrito todas las dianas reconocidas por estos anticuerpos. La inmunofluorescencia sobre células HUVEC constituye una técnica sensible y simple para el cribado de AECA. Además, aunque no aporta información acerca de la diana específica de los anticuerpos, sí que permite localizar el antígeno dentro de la célula y, por lo tanto, asignar un patrón de fluorescencia.

Con el fin de establecer el papel de los AECA post-trasplante sobre la evolución del trasplante renal, en ausencia de otros anticuerpos, seleccionamos de nuestra cohorte inicial de 727 receptores renales trasplantados entre los años 2005-2011 en el Hospital

12 de Octubre (Madrid) un total de 324 pacientes sin anticuerpos anti-HLA, anti-MICA ni anti-AT1R, con el objetivo de:

1. Estudiar la sensibilización, pre-trasplante y *de novo*, frente a antígenos endoteliales en receptores de trasplante renal.
2. Comprobar si la presencia de AECA post-trasplante en el suero del receptor de un injerto renal está relacionada con la peor supervivencia del paciente y del injerto, así como la tasa de rechazo.
3. Determinar el riesgo de rechazo del injerto renal por la presencia de AECA post-trasplante, independientemente de otras variables.
4. Caracterizar los patrones de inmunofluorescencia indirecta de los AECA y su posible asociación con los eventos de rechazo.

CONCLUSIONES

1. En nuestra cohorte de receptores renales sin anticuerpos anti-HLA, anti-MICA y anti-AT1R, encontramos que los individuos que desarrollaron AECA *de novo* después del trasplante muestran un mayor peso corporal, es más probable que hayan recibido diálisis peritoneal pre-trasplante y tratamiento inmunosupresor con CsA post-trasplante.
2. La presencia de AECA *de novo* en el suero de receptores renales no afecta a la supervivencia del paciente y del injerto, pero sí aumenta el riesgo de padecer un evento de rechazo, cuando lo comparamos con el grupo que no ha desarrollado AECA post-trasplante. Por su parte, los AECA preformados no están asociados a la peor evolución del trasplante renal.
3. La presencia de AECA *de novo* confiere el mayor riesgo de rechazo del trasplante renal, de forma independiente a otras variables como el sexo femenino del receptor, que también aumenta el riesgo, o la edad del receptor entre los 36 y los 70 años que, por el contrario, lo disminuye.
4. Describimos seis patrones diferentes en pacientes con AECA preformados: anti-citoesqueleto, anti-nucleares, punteado discreto citoplasmático (CDS), similar al patrón anti-mitocondriales, anti-aparato de Golgi y similar a “*rod and rings*”. En individuos con AECA *de novo*, solamente encontramos los tres primeros. Todos los pacientes con AECA *de novo* y episodios de rechazo presentaron los patrones anti-nuclear y anti-citoesqueleto.

CAPÍTULO 3

PUBLICACIÓN

Isolated De Novo Antiendothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection

Elena Sánchez-Zapardiel, MSc,¹ Esther Mancebo, PhD,^{1,2} María Díaz-Ordoñez, BSc,³
 Lucía de Jorge-Huerta, BSc,³ Lara Ruiz-Martínez, BSc,³
 Antonio Serrano, MD, PhD,^{1,2,4} María J. Castro-Panete, PhD,^{1,2}
 Alberto Utrero-Rico, BSc,^{2,3} Amado de Andrés, MD, PhD,⁵
 José M. Morales, MD, PhD,^{2,5} Sara Domínguez-Rodríguez, BSc,³ and
 Estela Paz-Artal, MD, PhD^{1,2,3,4}

Background: Studies analyzing the role of antiendothelial cell antibodies (AECAs) in large series of kidney transplant recipients are scarce, and HLA, MHC (major histocompatibility complex) class I-related chain A (MICA), and angiotensin II type 1 receptor have not been formally excluded as targets.

Study Design: Retrospective study of a cohort of kidney transplant recipients.

Setting & Participants: 324 kidney transplant recipients who were negative for anti-HLA, anti-MICA, and anti-angiotensin II type 1 receptor antibodies were tested for AECAs in pre- and posttransplantation serum samples.

Predictors: AECA-positive (preformed [pre⁺/post⁺] vs de novo [pre⁻/post⁺]) versus AECA-negative (pre⁻/post⁻) before or after transplantation.

Outcomes: Patient mortality, transplant loss, and acute rejection events.

Results: 66 (20%) patients were AECA positive (39 [12%] preformed, 27 [8%] de novo) and 258 (80%) were AECA negative. During a follow-up of 10 years, 7 (18%) AECA pre⁺/post⁺ patients had rejections compared with 14 (52%) AECA pre⁻/post⁺ and 57 (22%) AECA pre⁻/post⁻ recipients (OR, 3.80; *P* = 0.001). AECA pre⁻/post⁺ status emerged as an independent risk factor for transplant rejection compared to the AECA pre⁻/post⁻ group (OR, 5.17; *P* < 0.001). However, AECA pre⁺/post⁺ and AECA pre⁻/post⁺ patients did not show higher risk for either patient death (ORs of 1.49 [*P* = 0.7] and 1.06 [*P* = 0.9], respectively) or transplant loss (ORs of 1.22 and 0.86, respectively; *P* for both = 0.8) compared to the AECA pre⁻/post⁻ population.

Limitations: Retrospective study. Posttransplantation sera were collected before or after rejection, entailing a nearly cross-sectional relationship between the exposure and outcome. Lack of identification of precise antigens for AECAs.

Conclusions: De novo AECAs may be associated with rejection. These antibodies might serve as biomarkers of endothelium damage in kidney transplant recipients.

Am J Kidney Dis. ■(■):■-■. © 2016 by the National Kidney Foundation, Inc.

INDEX WORDS: Anti-endothelial cell antibodies (AECAs); de novo antibodies; allograft rejection; immunofluorescence patterns; kidney transplantation; acute rejection; allograft loss; mortality.

Kidney transplant recipients can develop allo- and/or autoantibodies, before and after transplantation, that may contribute to transplant deterioration and eventual loss. HLA, MHC (major histocompatibility complex) class I-related chain A (MICA), and angiotensin II type 1 receptor (AT₁R) are well-recognized targets for antibody responses in patients who underwent transplantation. Due to their polymorphic nature, HLA and MICA alloantigens frequently elicit humoral responses, anti-HLA and anti-MICA antibodies being major contributors for antibody-mediated rejection.¹ Anti-AT₁R antibodies (probably both allo- and autoreactive) may cause rejections, characterized by prominent vascular features.^{2,3}

Antiendothelial cell antibodies (AECAs) are a heterogeneous family of antibodies that recognize different antigens on endothelial cells. Although AECAs have been mainly related to the development

of systemic autoimmune diseases,⁴ they have also been detected in heart and kidney transplant recipients. Regarding kidney transplantation, several case reports describe the presence of these antibodies in the serum of patients having hyperacute

From the ¹Department of Immunology and ²Research Institute I+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ³School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; ⁴Section of Immunology, Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain; and ⁵Department of Nephrology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain.

Received January 19, 2016. Accepted in revised form July 6, 2016.

Address correspondence to Elena Sánchez-Zapardiel, MSc, Avda de Córdoba s/n, 28041, Madrid, Spain. E-mail: eszapardiel@gmail.com

© 2016 by the National Kidney Foundation, Inc.

0272-6386

<http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.07.019>

rejection.⁵⁻⁸ Nevertheless, AECAs have been mainly associated with acute rejection and early transplant loss.⁹⁻¹⁵ Acute rejection episodes are more frequently described as multiple^{12,13} or severe¹⁴ among AECA-positive recipients. In the study of a cohort of 226 kidney transplant recipients, Sun et al¹⁵ found that de novo AECAs were associated with higher risk for steroid-resistant rejection episodes. They also demonstrated an association of de novo AECAs with the presence of glomerulitis and peritubular capillary inflammation and no correlation with C4d deposition at the time of kidney biopsy. Furthermore, AECAs have been related to decreased long-term transplant survival and increased frequency of chronic allograft nephropathy.¹²

Despite these reports that associate AECAs with deterioration of the kidney transplant, whether AECAs cause rejection or arise after previous damage of the transplant is not known. Based on the presence of de novo AECAs before rejection in 3 of 4 post-transplantation serum samples obtained from HLA-negative kidney transplant recipients, Ronda et al¹⁰ reported that AECAs can directly cause rejection. Using proteomic techniques to identify the target proteins for AECAs,¹⁶ 9 autoantigens (eg, nucleolin, vimentin, and α -tubulin) and alloantigens (eg, MICA and human keratin 1) have been found in sera of anti-HLA-negative kidney transplant recipients who showed positive reactions with a panel of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by flow cytometry. In a recent analysis,¹⁷ high-density protein arrays were used to investigate sera of endothelial cell crossmatch-positive kidney recipients undergoing antibody-mediated rejection without donor-specific anti-HLA antibodies. Four different antigenic targets

expressed on vascular endothelium (endoglin, Fms-like tyrosine kinase 3 ligand, EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3, and intercellular adhesion molecule 4) were identified.

In this report, we have analyzed the prevalence of preformed and de novo AECAs in a cohort of kidney transplant recipients without anti-HLA, anti-MICA, or anti-AT₁R antibodies. Information for AECA antigen targets has been obtained by immunofluorescence analysis in HUVECs. We demonstrate that de novo AECAs, directed against either cytoskeleton or nuclear antigens, are independently associated with transplant rejection.

METHODS

Patients and Samples

We retrospectively analyzed 727 patients (452 men and 275 women; mean age, 54 ± 16 [standard deviation] years) who received a kidney transplant between 2005 and 2011 at Hospital 12 de Octubre. The initial cohort has been previously described.¹⁸ Characteristics of all 727 patients are summarized in Table S1 (provided as online supplementary material). A final cohort of 324 recipients was analyzed. Figure 1 shows the cohort selection and antibodies tested for each group. We retrospectively tested posttransplantation AECAs, selecting samples either close to the occurrence of a rejection event (mean time posttransplantation, 15 [range, 1-48] months) or between the first month and fourth year after transplantation among rejection-free patients (mean time posttransplantation, 20 [range, 1-49] months). Anti-HLA and anti-MICA antibodies were measured in both pre- and post-transplantation samples. Anti-AT₁R antibodies were tested in AECA-positive posttransplantation sera. Delayed graft function (DGF) refers to the requirement of dialysis in the first week posttransplantation. Serum creatinine levels ≤ 1.20 mg/dL for men and ≤ 0.90 mg/dL for women were considered to reflect optimal kidney function. Transplant loss and patient mortality were considered to calculate transplant and patient survival, respectively. Transplant rejection was defined as biopsy-proven

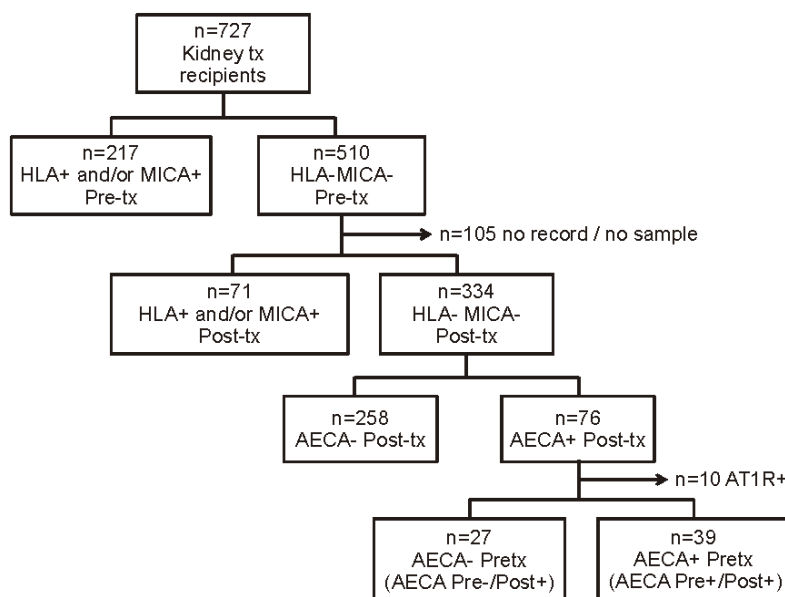


Figure 1. Flow diagram for cohort selection and antibodies measured within each group. Anti-HLA antibodies (HLA), anti-major histocompatibility complex class I-related chain A antibodies (MICA), and antiendothelial cell antibodies (AECAs) were tested in pre- (Pre-tx) and posttransplantation (Post-tx) serum samples. Angiotensin II type 1 receptor (AT₁R) antibodies were tested in AECA-positive samples to discard their potential effect on transplant evolution.

rejection in for-cause biopsies. This study was performed under informed consent and approved by the institutional review board (reference 10/014).

AECA Screening by Indirect Immunofluorescence With HUVECs

The AECAs were detected by indirect immunofluorescence (IIF) using the TITERPLANE technique developed by EURO-IMMUN (Medizinische Labordiagnostika AG) and following the manufacturer's instructions. Slides containing biochips coated with HUVECs were incubated with the patient's diluted serum (1:100), followed by fluorescein-labeled antihuman antibodies. Positive reactions were marked by cytoplasmic or nuclear staining on HUVECs.

Multiplexed Bead Array for Anti-HLA, Anti-MICA, and Other Specificities

Anti-HLA and anti-MICA antibodies were tested by multiplex microsphere-based flow cytometry (Luminex Technology, LAB-Screen Mixed kit; One Lambda) as previously described.¹⁸ The test was considered positive when the fluorescent signal of each bead was above the cutoff value provided by the manufacturer (anti-HLA class I and anti-MICA: standard fluorescence intensity > 15,000; anti-HLA class II: standard fluorescence intensity > 20,000). Antinuclear antibody—positive samples by IIF on HUVECs were tested by multiplexed bead assay (BioPlex 2200; Bio-Rad Laboratories) to detect the following specificities: double-stranded DNA, chromatin (soluble nucleoprotein), ribosomal P, Sjögren syndrome—related antigen A (SS-A/Ro), SS-A52, SS-A60, Sjögren syndrome—related antigen B (SS-B/La), centromere B, Smith antigen (Sm), ribonucleoprotein (RNP), RNP 68, RNP A, SmRNP, topoisomerase 1 (Scl 70), and histidyl tRNA synthetase (Jo-1). The positive cutoff for each assay is established by the manufacturer to equal 1.0 antibody index, except for RNP (2 antibody index) and double-stranded DNA (25 IU/mL). Positive samples by IIF on HUVECs that showed cytoskeleton staining were tested by multiplexed bead assay (BioPlex 2200) to identify baseline autoimmune reactivity due to anticyclic citrullinated peptide antibodies. The positive cutoff for each assay is established by the manufacturer to equal 3.0 U/mL.

Immunoblot

Positive samples by IIF on HUVECs that showed mitochondrial-like staining were tested by immunoblot (Liver-9-Line; Orgentec Diagnostika GmbH) to define target antigens such as myosin, desmin, F-actin, liver cytosol type 1, liver-kidney microsomal antibody type 1, soluble liver antigen/liver-pancreas, glycoprotein 210, Sp-100 nuclear antigen, and antimitochondrial antibody M2. The assay was performed according to the manufacturer's instructions.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Anti-AT₁R Antibodies

Anti-AT₁R antibodies were quantified (in units per milliliter) by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) AT₁R immunoassay (One Lambda). Antibody concentration > 17 U/mL was considered positive.

Statistical Analysis

Descriptive data are presented as mean \pm standard deviation and the respective range. Non-Gaussian variables are presented as median with interquartile range (IQR). Categorical data are presented as absolute number and proportion (percent). The significance of differences when comparing frequencies was determined by Fisher exact test or Pearson χ^2 test (with Yate's correction for continuity when necessary) and by *t* test or analysis of variance

(Kruskal-Wallis) when comparing mean values. Survival analysis was performed according to the Kaplan-Meier method and compared among groups by log-rank analysis. Clinically relevant variables for kidney transplant outcome were evaluated by binary logistic regression in univariate analysis. These variables were demographic features measuring recipient age, sex, and weight and donor age and sex. Donor category (either living donor, heart-beating donor, or donor after cardiac death) was also considered as a variable. Other variables included ischemia time (measured in hours), transplant number (either first one or more than one), dialysis type (either predialysis, hemodialysis, or peritoneal dialysis) and vintage (measured in months), HLA mismatches (considering from 0 up to 6 possible mismatches from HLA-A, HLA-B, and HLA-DR comparisons), DGF (either need or no need of dialysis early after transplantation) and treatment (either double therapy with tacrolimus and mycophenolate mofetil, triple therapy by adding corticosteroids to previous one, or quadruple therapy by adding monoclonal antibodies). The original disease (either vascular nephropathy, diabetes mellitus, glomerulonephritis/vasculitis, interstitial nephropathy, polycystic kidney disease, or other diseases) was also considered as a variable. Variables with $P < 0.1$ in univariate analysis were introduced in the multivariate model to assess their independent effect. $P < 0.05$ was considered significant. The software packages SPSS (version 18.0; IBM), GraphPad Prism (version 5.02; GraphPad Software), and MedCalc (version 13.3.0; MedCalc Software) were used for statistical analysis.

RESULTS

Characteristics of Cohort

From our initial cohort of patients who underwent transplantation (Fig 1), we first excluded 217 kidney recipients with preformed anti-HLA and/or anti-MICA antibodies, and among the remaining 510 individuals, we eliminated patients who had developed those antibodies after transplantation ($n = 71$) or did not have a sample or result recorded ($n = 105$). Then we analyzed AECAs in the serum of the remaining 334 transplant recipients (negative for both preformed and de novo anti-HLA and anti-MICA antibodies) and found 76 AECA-positive recipients. After removing 10 anti-AT₁R antibody—positive samples and by analyzing AECAs in the pretransplantation serum sample, we classified the 66 AECA-positive kidney recipients as AECA pre⁺/post⁺ (preformed AECA, $n = 39$) and AECA pre⁻/post⁺ (de novo AECA, $n = 27$). In summary, our final cohort consisted of 324 transplant recipients, which included 258 AECA-negative (AECA pre⁻/post⁻) patients and 66 AECA-positive patients who did not have anti-HLA, anti-MICA, or anti-AT₁R antibodies.

Features Associated With De Novo AECAs

We first investigated whether epidemiologic and clinical features differed when comparing AECA-positive versus AECA-negative patients (Table 1). AECA pre⁻/post⁺ recipients showed higher weight (78 ± 14 vs 69 ± 13 kg in AECA pre⁻/post⁻ and 67 ± 10 kg in AECA pre⁺/post⁺; $P = 0.001$) and were more likely to have received peritoneal dialysis

Table 1. Demographic and Clinical Features in Posttransplantation AECA-Positive and AECA-Negative Patients

Characteristic	AECA-Positive (n = 66 [20%])		AECA-Negative (pre ⁻ /post ⁻ ; n = 258 [80%])	P ^a
	Pre ⁺ /Post ⁺ (n = 39 [12%])	Pre ⁻ /Post ⁺ (n = 27 [8%])		
Transplant no.				0.5
First transplant	39 (100)	27 (100)	252 (98)	
Subsequent transplant	0 (0)	0 (0)	6 (2)	
Cold-ischemia time, h	17.9 ± 7.0 (0.5-28.0)	16.3 ± 6.0 (2.6-28.3)	17.3 ± 7.0 (1.0-33.6)	0.7
Dialysis vintage, mo	18 ± 19 (0-76)	28 ± 28 (0-95)	20 ± 21 (0-166)	0.1
Dialysis type				0.05
Hemodialysis	29 (74)	17 (63)	199 (77)	
Peritoneal dialysis	2 (5)	7 (26)	33 (13)	
Not dialysis-dependent	8 (21)	3 (11)	26 (10)	
Recipient weight, kg	67 ± 10 (41-87)	78 ± 14 (57-111)	69 ± 13 (33-102)	0.001
Recipient sex				0.07
Male	23 (59)	23 (85)	173 (67)	
Female	16 (41)	4 (15)	85 (33)	
Donor sex				0.8
Male	26 (67)	19 (70)	167 (65)	
Female	13 (33)	8 (30)	91 (35)	
Recipient age, y	58 ± 16 (25-81)	53 ± 15 (23-79)	53 ± 16 (19-81)	0.1
Donor age, y	55 ± 19 (15-82)	49 ± 18 (18-80)	52 ± 18 (7-85)	0.3
Donor category				0.9
Living donor	2 (5)	1 (4)	14 (6)	
Donor after cardiac death	12 (31)	7 (26)	68 (26)	
Heart-beating donor	25 (64)	19 (70)	176 (68)	
HLA mismatches				0.9
0-3	9 (23)	7 (26)	61 (24)	
4-6	30 (77)	20 (74)	197 (76)	
Delayed graft function				0.04
Yes	15 (38)	12 (44)	149 (58)	
No	24 (62)	15 (56)	109 (42)	

Note: Values for categorical variables are given as count (percentage); for continuous variables, as mean ± standard deviation (range).

Abbreviation: AECA, antiendothelial cell antibody.

^aComparisons are established among all 3 groups.

than the other groups (26% vs 13% in AECA pre⁻/post⁻ and 5% in AECA pre⁺/post⁺; $P = 0.05$). We also noticed a nominally longer dialysis vintage within this group, although differences were not statistically significant (28 ± 28 months in AECA pre⁻/post⁺ vs 20 ± 21 in AECA pre⁻/post⁻ and 18 ± 19 in AECA pre⁺/post⁺; $P = 0.1$). There was a greater female predominance among AECA pre⁺/post⁺ patients than in the other groups, although these differences were not statistically significant either. DGF was significantly less likely within AECA pre⁺/post⁺ patients compared with the other groups (38% in AECA pre⁺/post⁺ vs 58% in AECA pre⁻/post⁻ and 44% in AECA pre⁻/post⁺; $P = 0.04$).

Table 2 shows that immunosuppressive treatment was similar among AECA-positive and AECA-negative recipients except for calcineurin inhibitor use. As expected, most patients received tacrolimus

(97% in AECA pre⁺/post⁺, 93% in AECA pre⁻/post⁺, and 98% in AECA pre⁻/post⁻). Nevertheless, we observed that cyclosporine was used in 2 patients within the AECA pre⁻/post⁺ group and in only 1 patient within the AECA pre⁻/post⁺ and AECA pre⁻/post⁻ groups (7%, 3%, and <1%, respectively; $P = 0.02$). The few calcineurin-free patients ($n = 5$) were all AECA pre⁻/post⁻. Finally, we did not find significant differences regarding the original disease.

Transplant Rejection, Transplant Survival, and Patient Survival

We next explored the role of AECAs on kidney transplant recipients by examining transplant rejection, transplant survival, and patient survival. When comparing AECA pre⁺/post⁺ ($n = 39$) and AECA pre⁻/post⁺ ($n = 27$) versus AECA pre⁻/post⁻ ($n = 258$) groups, we did not find statistically

Table 2. Treatment and Original Diseases in Posttransplantation AECA-Negative and AECA-Positive Patients

Characteristic	AECA-Positive (n = 66 [20%])		AECA-Negative (pre ⁻ /post ⁻ ; n = 258 [80%])	P
	Pre ⁺ /Post ⁺ (n = 39 [12%])	Pre ⁻ /Post ⁺ (n = 27 [8%])		
Treatment				0.4
Double therapy: TAC+MMF/AZA	1 (2)	1 (4)	2 (1)	
Triple therapy: CS + TAC + MMF/AZA	5 (13)	6 (22)	60 (23)	
Quadruple therapy: mAb + CS + TAC + MMF/AZA	33 (85)	20 (74)	195 (76)	
Calcineurin inhibitor use				0.02
Cyclosporine	1 (3)	2 (7)	1 (<1)	
TAC	38 (97)	25 (93)	252 (98)	
No calcineurin inhibitors	0 (0)	0 (0)	5 (2)	
Antiproliferative use				0.7
AZA	4 (10)	5 (19)	28 (11)	
MMF	34 (87)	22 (81)	227 (88)	
No antiproliferatives	1 (3)	0 (0)	3 (1)	
mTOR inhibitors				0.8
Everolimus	1 (3)	0 (0)	4 (2)	
Sirolimus	0 (0)	0 (0)	4 (2)	
No mTOR inhibitors	38 (97)	27 (100)	250 (96)	
Induction status				0.3
Induction (basiliximab/Tg)	35 (90)	21 (78)	203 (79)	
No induction	4 (10)	6 (22)	55 (21)	
Corticosteroid use				0.6
Yes	38 (97)	27 (100)	255 (99)	
No	1 (3)	0 (0)	3 (1)	
Other treatments				
IVIg	0 (0)	0 (0)	1 (<1)	
Plasmapheresis	0 (0)	0 (0)	1 (<1)	
Rituximab	0 (0)	0 (0)	1 (<1)	
Belatacept	0 (0)	0 (0)	1 (<1)	
Original disease ^a				0.9
Vascular nephropathy ^b	12 (31)	8 (30)	71 (28)	
Diabetes mellitus (diabetic nephropathy)	10 (26)	10 (37)	64 (25)	
Glomerulonephritis/vasculitis	13 (33)	10 (37)	99 (38)	
Interstitial nephropathy	3 (8)	3 (11)	24 (9)	
Polycystic kidney disease	6 (15)	1 (4)	30 (12)	
Other diseases ^c	4 (10)	2 (7)	31 (12)	
Unknown cause	6 (15)	3 (11)	21 (8)	

Note: Values given as count (proportion).

Abbreviations: AECA, antiendothelial cell antibody; AZA, azathioprine; CS, corticosteroid; IVIg, intravenous immunoglobulin; mAb, monoclonal antibody; MMF, mycophenolate mofetil; mTOR, mammalian target of rapamycin; TAC, tacrolimus; Tg, thymoglobulin.

^aMore than 1 disease can be present.

^bNephrosclerosis, ischemic nephropathy, malignant hypertension, and atherosclerosis.

^cKidney reflux, kidney tumors, glomerular hyperfiltration, and single kidney.

significant differences in either transplant loss (odds ratios [ORs] of 1.22 and 0.86 in AECA pre⁺/post⁺ and AECA pre⁻/post⁺ patients, respectively; $P = 0.8$; Table 3) or in patient mortality (ORs of 1.49 [$P = 0.7$] and 1.06 [$P = 0.9$] in AECA pre⁺/post⁺ and AECA pre⁻/post⁺ patients, respectively; Table 3). In contrast, AECA pre⁻/post⁺ status emerged as a risk factor for transplant rejection (ORs of 0.77 [$P = 0.6$] and 3.80 [$P < 0.001$] in AECA pre⁺/post⁺ and AECA pre⁻/post⁺, respectively;

Table 3). To further describe the risk for transplant rejection related to AECA pre⁻/post⁺, we studied other variables potentially associated with rejection events in our cohort (Table 4). First, univariate analysis showed that AECA pre⁻/post⁺ (OR, 3.80; $P = 0.001$), recipient age of 36 to 70 years (OR, 0.53; $P = 0.08$), ischemia time of 11 to 20 hours (OR, 0.45; $P = 0.04$), dialysis vintage of 7 to 12 months (OR, 1.93; $P = 0.03$), and recipient female sex (OR, 0.60; $P = 0.08$) could be potential confounders. After

Table 3. Percentage and Risk for Patient Mortality, Transplant Loss, and Acute Rejection Events in Posttransplantation AECA-Negative and AECA-Positive Groups

Outcome	AECA-Positive (n = 66 [20%])		AECA Negative (pre ⁻ /post ⁻ ; n = 258 [80%])
	Pre ⁺ /Post ⁺ (n = 39 [12%])	Pre ⁻ /Post ⁺ (n = 27 [8%])	
Patient mortality			
No. (%)	2 (5)	1 (4)	14 (5)
OR (95% CI)	1.49 (0.19-11.81)	1.06 (1.69-8.54)	1.00 (reference)
P	0.7	0.9	
Transplant loss			
No. (%)	4 (10)	2 (7)	23 (9)
OR (95% CI)	1.22 (0.27-5.50)	0.86 (0.28-2.62)	1.00 (reference)
P	0.8	0.8	
Transplant rejection			
No. (%)	7 (18)	14 (52)	57 (22)
OR (95% CI)	0.77 (0.32-1.84)	3.80 (1.69-8.54)	1.00 (reference)
P	0.6	0.001	

Abbreviations: AECA, antiendothelial cell antibody; CI, confidence interval; OR, odds ratio.

performing multivariate analysis, we found that AECA pre⁻/post⁺ remained independently associated with higher risk for kidney transplant rejection compared to the AECA pre⁻/post⁻ group (OR, 5.17; $P < 0.001$). However, recipient age of 36 to 70 years was significantly associated with lower risk for rejection compared to recipient age younger than 35 years (OR, 0.43; $P = 0.04$) and female sex with higher risk for rejection compared to male sex (OR, 1.90; $P = 0.05$).

We observed that all biopsy-proven rejection episodes among AECA-positive patients were acutely developed and compared with the remaining group, they appeared earlier after transplantation (2 [IQR, 1-13] months in AECA pre⁺/post⁺ and 2 [IQR, 0-12] months in AECA pre⁻/post⁺ vs 4 [IQR, 1-12] in AECA pre⁻/post⁻; $P = 0.7$). Within the AECA pre⁻/post⁺ group, multiple rejection episodes were more frequent. However, differences in time, type, and grade of rejection; C4d deposition; and frequency of rejection episodes did not reach statistical significance in the comparison of the AECA pre⁺/post⁺, AECA pre⁻/post⁺, and AECA pre⁻/post⁻ cohorts (Table S2).

Regarding kidney function, during the first week after transplantation, all 3 groups showed serum creatinine levels above the optimal range, but those values were significantly higher among AECA pre⁻/post⁺ patients than in the other 2 groups (7.20 [IQR, 5.80-8.71] mg/dL in AECA pre⁻/post⁺ vs 6.05 [IQR, 3.45-7.15] mg/dL in AECA pre⁻/post⁻ and 6.38 [IQR, 4.56-8.43] mg/dL in AECA pre⁺/post⁺; $P = 0.03$; Fig 2). However, serum creatinine levels decreased to <3 mg/dL from the first month onward in all 3 groups, and differences were not significant at months 1, 3, and 12 ($P = 0.2$, $P = 0.8$, and $P = 0.3$, respectively; Fig 2).

Presence of Anticytoskeleton or Antinuclear Antibodies

In our cohort, 258 (80%) recipients were AECA pre⁻/post⁻ (Fig 3A). The AECA-positive IIF pattern was recorded in 65 of 66 of the AECA-positive group. Anticytoskeleton antibodies (Fig 3B) were the most frequent AECA IIF pattern (n = 20), but none of these samples had anticyclic citrullinated peptide antibodies (antibodies against cyclic citrullinated peptides that may appear as positive by IIF because of the detection of filaggrin and other cytoskeleton proteins). We found 14 antinuclear-positive samples on HUVECs (Fig 3C). After analysis in a multiplexed system with antigen specificities commonly found in systemic autoimmune diseases, one of those 14 sera had anti-ribosomal P antibodies and another one had anti-chromatin antibodies, whereas the other 12 were negative. Cytoplasmic discrete speckles, which form from the binding of antibodies to late endosomal/lysosomal antigens (Fig 3D), appeared in 16 serum samples. We found 12 mitochondrial-like pattern sera (Fig 3E), 3 of which showed reactivity against anti-mitochondrial antibody M2, liver cytosol type 1, and desmin, respectively, commonly related to autoimmune liver diseases. The other 9 sera were negative by immunoblot. Two AECA-positive recipients showed a cytoplasmic rod and rings-like pattern, normally observed in hepatitis C virus-infected patients treated with interferon alfa and ribavirin, although both patients were hepatitis C virus-negative (Fig 3F). Finally, 1 AECA-positive sample displayed a pattern similar to Golgi apparatus staining (Fig 3G).

The distribution of frequencies for these IIF patterns was different in AECA pre⁺/post⁺ patients and AECA pre⁻/post⁺ patients (Fig 3H). All 6 identified AECA

Table 4. Transplant Rejection Univariate and Multivariate Analysis in Posttransplantation De Novo AECA-Positive Patients

	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
AECA status				
AECA pre ⁺ /post ⁺	0.77 (0.32-1.84)	0.6	0.78 (0.32-1.94)	0.6
AECA pre ⁻ /post ⁺	3.80 (1.69-8.54)	0.001	5.17 (2.09-12.80)	<0.001
AECA pre ⁻ /post ⁻	1.00 (reference)		1.00 (reference)	
Recipient age				
≤35 y	1.00 (reference)		1.00 (reference)	
36-70 y	0.53 (0.27-1.07)	0.08	0.43 (0.19-0.97)	0.04
71-81 y	0.95 (0.41-2.21)	0.9	0.63 (0.22-1.75)	0.4
Ischemia time				
≤10 h	1.00 (reference)		1.00 (reference)	
11-20 h	0.45 (0.21-0.96)	0.04	0.53 (0.23-1.25)	0.2
21-40 h	1.11 (0.56-2.19)	0.8	1.39 (0.60-3.20)	0.4
Subsequent transplant, vs first	1.59 (0.29-8.86)	0.6		
Dialysis vintage				
>24 mo	1.00 (reference)		1.00 (reference)	
13-24 mo	1.05 (0.49-2.26)	0.9	1.07 (0.47-2.43)	0.9
7-12 mo	1.93 (1.05-3.55)	0.03	1.93 (0.99-3.76)	0.05
Dialysis type				
Not dialysis-dependent	1.00 (reference)			
Hemodialysis	1.03 (0.46-2.31)	0.9		
Peritoneal dialysis	0.73 (0.25-2.15)	0.6		
Recipient weight				
30-60 kg	1.00 (reference)			
61-90 kg	0.83 (0.46-1.50)	0.5		
91-120 kg	1.16 (0.40-3.38)	0.8		
Female sex of recipient	0.60 (0.34-1.07)	0.08	1.90 (1.01-3.58)	0.05
Female sex of donor	1.36 (0.81-2.31)	0.3		
Donor age				
≤35 y	1.00 (reference)			
36-70 y	1.76 (0.85-3.63)	0.1		
71-81 y	1.54 (0.66-3.61)	0.3		
Donor category				
Living donor	1.00 (reference)			
Heart-beating donor	1.79 (0.50-6.45)	0.4		
Donor after cardiac death	0.90 (0.23-3.53)	0.9		
4-6 HLA mismatches, vs 0-3	0.98 (0.53-1.79)	0.9		
Delayed graft function	0.98 (0.59-1.63)	0.9		
Treatment ^a				
Quadruple therapy	1.00 (reference)			
Triple therapy	1.34 (0.74-2.43)	0.3		
Double therapy	3.41 (0.47-24.76)	0.2		
Vascular nephropathy ^a	1.16 (0.60-2.22)	0.7		
Diabetes mellitus	0.82 (0.45-1.49)	0.5		
Glomerulonephritis/vasculitis	1.15 (0.63-2.08)	0.7		
Interstitial nephropathy	1.64 (0.50-2.73)	0.7		
Polycystic kidney disease	0.86 (0.37-1.96)	0.7		
Other diseases ^a	0.83 (0.39-1.76)	0.6		

Abbreviations: AECA, antiendothelial cell antibody; CI, confidence interval; OR, odds ratio.

^aSee Table 2 for details.

patterns (anticytoskeleton, cytoplasmic discrete speckles, antinuclear, mitochondrial-like, rod and rings, and anti-Golgi apparatus) were present among recipients with preformed AECAs, the mitochondrial-

like pattern being the most common in this group of patients (31%). AECA pre⁺/post⁺ patients showed the same IIF patterns in both pre- and posttransplantation samples, indicating that they were not likely sensitized

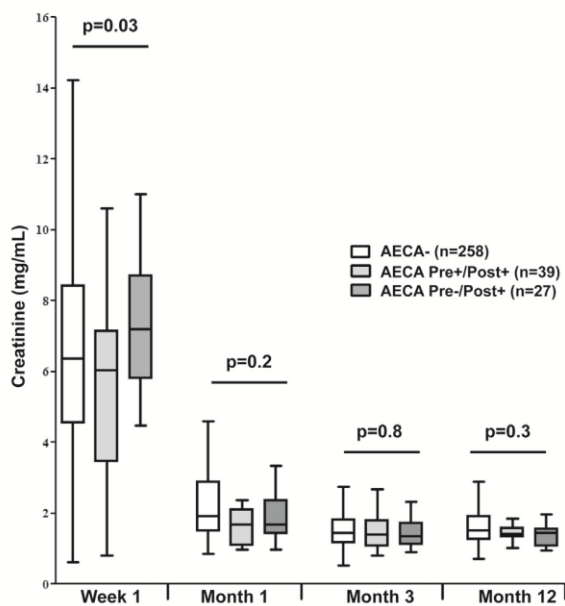


Figure 2. Median serum creatinine levels and interquartile ranges at first week, month 1, month 3, and month 12 among antiendothelial cell antibody (AECA) pre⁻/post⁻, AECA pre⁺/post⁺, and AECA pre⁻/post⁺ recipients.

against new endothelial antigens after transplantation. By contrast, only 3 IIF AECA patterns (anticytoskeleton, cytoplasmic discrete speckles, and antinuclear) were observed in patients with de novo antibodies. Anticytoskeleton antibodies were the most frequent AECAs because they were present in almost half the AECA pre⁻/post⁺ recipients (46%). The AECA patterns corresponding to mitochondria-like, rod and rings, and Golgi apparatus were found in AECA pre⁺/post⁺ patients, whereas they were absent in the group of patients with de novo AECAs (31%, 5%, and 1% vs 0%, respectively).

Finally, the distribution of AECA IIF profiles in AECA pre⁺/post⁺ and pre⁻/post⁺ patients was compared, distinguishing between individuals with rejected and non-rejected transplants. As shown in Fig 4A, no IIF pattern was particularly over-represented among patients with preformed AECAs that experienced rejection events ($P = 0.9$). Conversely, among AECA pre⁻/post⁺ recipients, all rejecters ($n = 14$) had either anticytoskeleton or antinuclear antibodies. Only 5 patients with these antibodies were free from rejection. None of AECA pre⁻/post⁺ patients who showed a cytoplasmic discrete speckles pattern underwent a rejection event ($P = 0.003$; Fig 4B).

DISCUSSION

In the present study, we show that acute kidney rejections are significantly and independently associated with de novo, but not with preformed, AECAs.

This result corroborates similar observations reported by Sun et al.^{15,19} Moreover, because our study excluded sensitized recipients, we were able to unambiguously demonstrate that the rejection-related de novo AECAs recorded in our patients are directed against endothelial antigen targets other than the classic HLA and MICA alloantigens or AT₁R proteins.

In our population, most patients with AECAs before transplantation were women, suggesting that the development of those antibodies might be related to pregnancy or autoimmune diseases, although differences were not statistically significant. The development of AECAs after transplantation seemed more associated with peritoneal dialysis. However, we noticed that individuals who did not receive peritoneal dialysis showed the worst posttransplantation evolution, accumulating 86% of rejection events within the group. Other authors did not find a relationship between type of dialysis and AECAs, although they reported that AECA titers were significantly higher in hemodialysis-treated patients before transplantation.²⁰ Regarding immunosuppressive treatments, most of our recipients received tacrolimus, whereas only 4 (who underwent transplantation in May 2006 to March 2007) received immunosuppression with cyclosporine, 3 of whom showed de novo AECAs. Cyclosporine has been previously related to an increased level of circulating endothelial cells²¹ and antiendothelial antibodies against vimentin,²² reflecting endothelial cell damage.

Because AECAs have been previously detected by a variety of techniques, including IIF, flow cytometry, ELISA, and Western blotting, studies investigating AECA target antigens incorporate biases inherent to the experimental method. Proteomic approaches based on immunoblotting disrupt the native conformation of proteins, and flow cytometry does not allow for describing which is the target for serum antibodies. Cyto-ELISA is currently the standard method for detecting labile cell-surface epitopes, although other ELISA variations, such as surface protein capture ELISA, have been developed to immobilize membrane proteins from endothelial cells, maintaining epitopic conformation.²³ In our study, we selected the IIF method because HUVEC slides are commercially available and IIF is a common technical skill among laboratories providing services for transplant immunology. Although IIF with HUVECs does not enable the identification of specific targets, it allows defining AECA patterns according to the location of antigens in the different cellular compartments. Thus, the combination of IIF and protein microarray in future works would help elucidate which pattern would be displayed by each target protein recognized by AECAs in serum samples from transplant recipients.

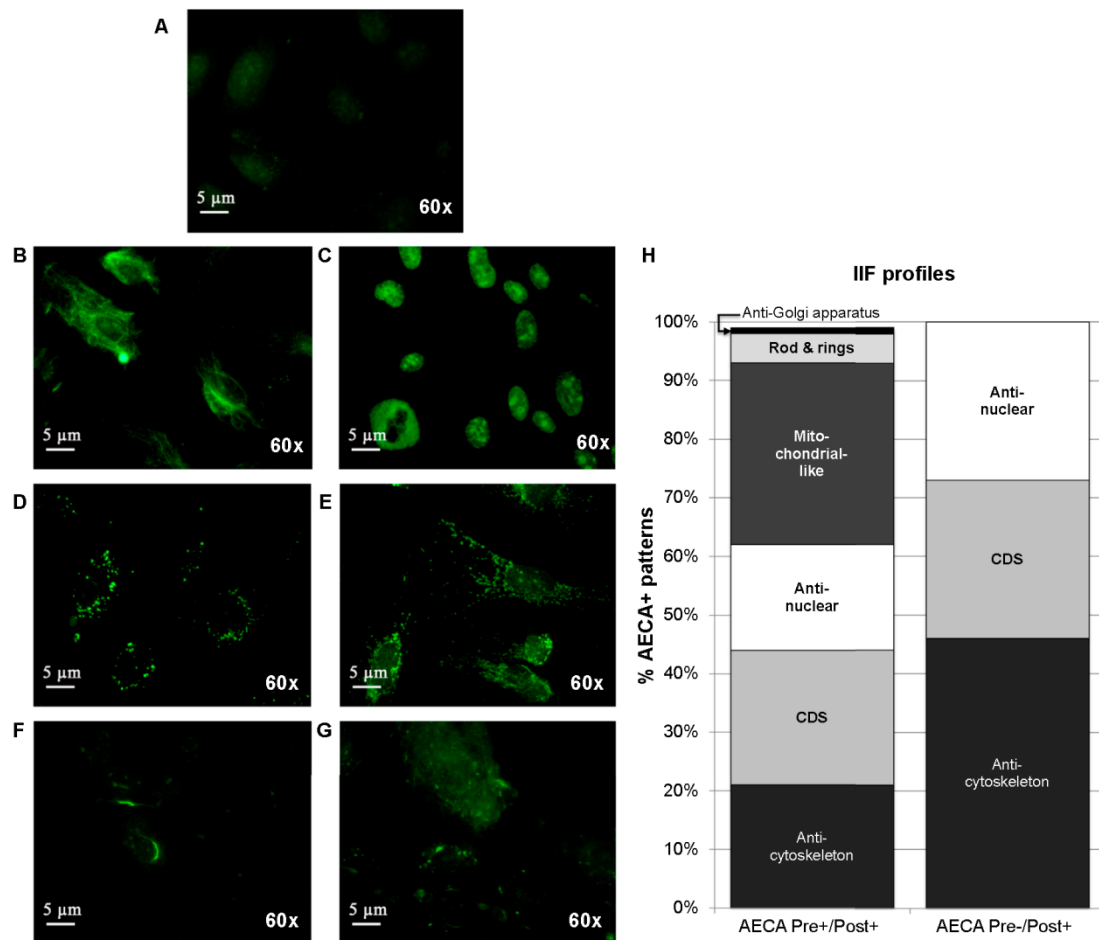


Figure 3. Immunofluorescence profiles for antiendothelial cell antibodies (AECAs) using human vein endothelial cells. (A) Negative serum sample, (B) anticytoskeleton, (C) antinuclear, (D) anti-late endosome/lysosome, (E) mitochondrial-like, (F) rod and rings-like, and (G) anti-Golgi apparatus patterns. (H) Distribution of immunofluorescence profiles among preformed AECAs (AECA pre⁺/post⁺) and de novo (AECA pre⁻/post⁺) positive patients in original magnification, $\times 60$. Abbreviations: CDS, cytoplasmic discrete speckles; IIF, indirect immunofluorescence.

By analyzing serum samples from patients with chronic kidney failure by IIF with HUVECs, 6 different AECA profiles are defined, to our knowledge for the first time. In other studies using IIF with HUVECs, only the cytoplasmic granular fluorescence pattern, defined here as cytoplasmic discrete speckles, was considered as AECA-positive.^{15,19} However, the potential clinical meaning of the remaining AECA IIF patterns recorded by us is supported by other groups that report cytoskeletal/cytoplasmic,^{24,25} mitochondrial,²⁶ and nuclear²⁷ antigens as significant AECA targets in transplantation,²⁸⁻³¹ as well as in other pathologies with vascular involvement.²⁵⁻²⁷

In this study, we analyzed sera from transplant recipients that were obtained at different time points after transplantation and samples were collected either before or after the rejection event (Fig S1). This retrospective approach makes it difficult to ascertain whether the emergence of AECAs in transplant recipients

preceded the transplant rejection and are then pathogenic or, alternatively, they appeared after the rejection as a consequence of the prior endothelial injury. Nevertheless, we hypothesize that the de novo AECAs reported in our cohort of patients are not directly causing rejections but mostly appear after the rejection or other forms of injury (ischemia, calcineurin toxicity, or infection) as markers of endothelial damage. Interestingly, previous works have shown polyreactive antibodies that emerge during antibody-mediated rejections and bind to apoptotic cells³² or antibodies against specific targets such as perlecan or agrin, neoantigens exposed after the apoptosis of endothelial cells.^{31,33} Our hypothesis is based on the following observations: (1) DGF was higher in patients with de novo versus preformed AECAs, (2) creatinine levels at week 1 posttransplantation were higher in patients with de novo versus preformed AECAs, (3) rejections in the de novo AECA group were not predominantly humoral

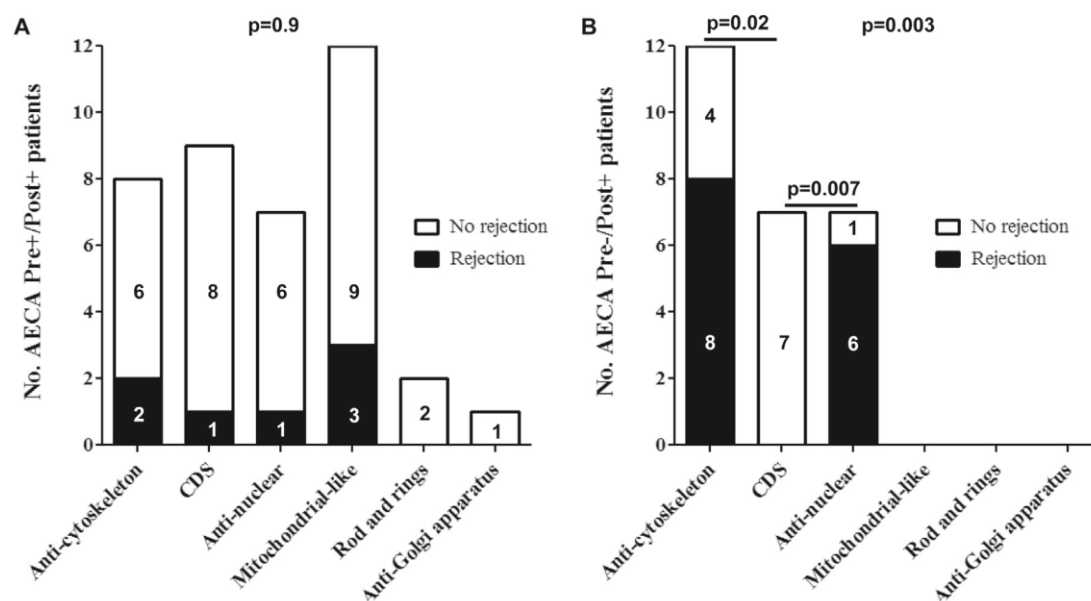


Figure 4. Distribution of immunofluorescence profiles among (A) antiendothelial cell antibody (AECA) pre⁺/post⁺ and (B) AECA pre⁻/post⁺ patients, distinguishing transplant-rejecting and nonrejecting groups. Abbreviation: CDS, cytoplasmic discrete speckles.

or C4d⁺, and (4) among pre⁻/post⁺ AECA recipients, all patients who had rejection had antibodies that bound either cytoskeleton or nuclear antigens, which is consistent with previous work reporting that the development of autoantibodies against vimentin and nucleolin was significantly increased in patients who had rejected kidney transplants.^{29,30,34}

Further investigation with larger cohorts and prospective approaches involving AECA pre- and post-rejection samples should be considered to clarify their role in the evolution of the transplanted kidney. Finally, it would also be important to decipher whether de novo AECAs arising after events that damage the transplanted kidney may amplify the alloimmune response and contribute to accelerated transplant loss. In this situation, de novo AECAs could be considered a useful biomarker for the detection of patients with endothelial damage and higher risk for chronic rejection.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Elena Cano and M^a Ángeles Delgado for excellent technical assistance.

Support: This work was supported by FIS, Instituto de Salud Carlos III, Proyecto Integrado 2013/00045. Spain (and partly financed by the European Regional Development Fund). The funders did not have any role in study design, collection, analysis and interpretation of data; writing the report; and the decision to submit the report for publication.

Financial Disclosure: The authors declare that they have no other relevant financial interests.

Contributions: Research idea and study design: ES-Z, AA, JMM, EP-A; conduction of experiments: MD-O, LJ-H, LR-M, AU-R, SD-R, data analysis/interpretation: ES-Z, EM, AS, MJC-

P; supervision or mentorship: EP-A. Each author contributed important intellectual content during manuscript drafting or revision and accepts accountability for the overall work by ensuring that questions pertaining to accuracy or integrity of any portion of the work are appropriately investigated and resolved. ES-Z takes responsibility that this study has been reported honestly, accurately, and transparently; that no important aspects of the study have been omitted; and that any discrepancies from the study as planned have been explained.

Peer Review: Evaluated by 2 external peer reviewers, a Statistical Editor, a Co-Editor, and the Editor-in-Chief.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1: Characteristics of study population of 727 kidney transplant patients.

Table S2: Allograft rejection parameters in posttransplantation AECA-positive and AECA-negative patients.

Figure S1: Time after transplantation when AECAs were measured in allograft-rejected patients.

Note: The supplementary material accompanying this article (<http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.07.019>) is available at www.ajkd.org

REFERENCES

- Puttarajappa C, Shapiro R, Tan HP. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. *J Transplant*. 2012;2012:193724.
- Dragun D, Muller DN, Brasen JH, et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2005;352(6):558-569.
- Reinsmoen NL, Lai CH, Heidecke H, et al. Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA antibody negative patients. *Transplantation*. 2010;90(12):1473-1477.
- Alessandri C, Bombardieri M, Valesini G. Pathogenic mechanisms of anti-endothelial cell antibodies (AECA): their prevalence and clinical relevance. *Adv Clin Chem*. 2006;42:297-326.

5. Sumitran-Karuppan S, Tyden G, Reinholt F, Berg U, Moller E. Hyperacute rejections of two consecutive renal allografts and early loss of the third transplant caused by non-HLA antibodies specific for endothelial cells. *Transplant Immunol.* 1997;5(4):321-327.
6. Grandtnerova B, Laca L, Jahnova E, et al. Hyperacute rejection of living related kidney graft caused by IgG endothelial specific antibodies with a negative monocyte cross-match. *Ann Transplant.* 2002;7(4):52-54.
7. Grandtnerova B, Mackova N, Hovorikova B, Jahnova E. Hyperacute rejection of living related kidney grafts caused by endothelial cell-specific antibodies: case reports. *Transplant Proc.* 2008;40(7):2422-2424.
8. Jackson AM, Kuperman MB, Montgomery RA. Multiple hyperacute rejections in the absence of detectable complement activation in a patient with endothelial cell reactive antibody. *Am J Transplant.* 2012;12(6):1643-1649.
9. Xavier P, Aires P, Sampaio S, et al. XM-ONE detection of endothelium cell antibodies identifies a subgroup of HLA-antibody negative patients undergoing acute rejection. *Transplant Proc.* 2011;43(1):91-94.
10. Ronda C, Borba SC, Ferreira SC, et al. Non-human leukocyte antigen antibodies reactive with endothelial cells could be involved in early loss of renal allografts. *Transplant Proc.* 2011;43(4):1345-1348.
11. Jackson AM, Lucas DP, Melancon JK, Desai NM. Clinical relevance and IgG subclass determination of non-HLA antibodies identified using endothelial cell precursors isolated from donor blood. *Transplantation.* 2011;92(1):54-60.
12. Ismail AM, Badawi RM, El-Agroudy AE, Mansour MA. Pretransplant detection of anti-endothelial cell antibodies could predict renal allograft outcome. *Exp Clin Transplant.* 2009;7(2):104-109.
13. Nakagawa Y, Saito K, Morioka T, Tomita Y, Takahashi K, Oite T. The clinical significance of antibody to vascular endothelial cells after renal transplantation. *Clin Transplant.* 2002;16(suppl 8):51-57.
14. Han F, Lv R, Jin J, et al. Pre-transplant serum concentrations of anti-endothelial cell antibody in panel reactive antibody negative renal recipients and its impact on acute rejection. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(10):1265-1269.
15. Sun Q, Cheng Z, Cheng D, et al. De novo development of circulating anti-endothelial cell antibodies rather than pre-existing antibodies is associated with post-transplant allograft rejection. *Kidney Int.* 2011;79(6):655-662.
16. Qin Z, Zou Y, Lavingia B, Stastny P. Identification of endothelial cell surface antigens encoded by genes other than HLA. A combined immunoprecipitation and proteomic approach for the identification of antigens recognized by antibodies against endothelial cells in transplant recipients. *Hum Immunol.* 2013;74(11):1445-1452.
17. Jackson AM, Sigdel TK, Delville M, et al. Endothelial cell antibodies associated with novel targets and increased rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(5):1161-1171.
18. Sanchez-Zapardiel E, Castro-Panete MJ, Castillo-Rama M, et al. Harmful effect of preformed anti-MICA antibodies on renal allograft evolution in early posttransplantation period. *Transplantation.* 2013;96(1):70-78.
19. Sun Q, Liu Z, Chen J, et al. Circulating anti-endothelial cell antibodies are associated with poor outcome in renal allograft recipients with acute rejection. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(5):1479-1486.
20. Shin YS, Yang CW, Ahn HJ, et al. Clinical significance of anti-endothelial cell antibody in renal transplant recipients. *Korean J Intern Med.* 2001;16(1):24-29.
21. Woywodt A, Schroeder M, Mengel M, et al. Circulating endothelial cells are a novel marker of cyclosporine-induced endothelial damage. *Hypertension.* 2003;41(3, pt 2):720-723.
22. Jurcevic S, Dunn MJ, Crisp S, et al. A new enzyme-linked immunosorbent assay to measure anti-endothelial antibodies after cardiac transplantation demonstrates greater inhibition of antibody formation by tacrolimus compared with cyclosporine. *Transplantation.* 1998;65(9):1197-1202.
23. Miura K, Aoun K, Yoshida S, Kurosawa Y. Autoantibodies directed against labile epitopes on cell surface proteins in autoimmune disease patients: proposal of a novel ELISA for the detection of anti-endothelial cell antibodies. *J Immunol Methods.* 2012;382(1-2):32-39.
24. Alvarez-Marquez A, Aguilera I, Blanco RM, et al. Positive association of anticytoskeletal endothelial cell antibodies and cardiac allograft rejection. *Hum Immunol.* 2008;69(3):143-148.
25. Ihn H, Sato S, Fujimoto M, et al. Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic sclerosis (SSc): association with pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol.* 2000;119(1):203-209.
26. Alard JE, Hillion S, Guillemin L, et al. Autoantibodies to endothelial cell surface ATP synthase, the endogenous receptor for hsp60, might play a pathogenic role in vasculitides. *PLoS One.* 2011;6(2):e14654.
27. Karasawa R, Yudoh K, Ozaki S, Kato T. Anti-endothelial cell antibodies (AECA) in patients with systemic vasculitis: our research using proteomics. *Expert Opin Biol Ther.* 2011;11(1):77-87.
28. Acevedo MJ, Caro-Oleas JL, Alvarez-Marquez AJ, et al. Antibodies against heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in patients with cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(9):1051-1059.
29. Qin Z, Lavingia B, Zou Y, Stastny P. Antibodies against nucleolin in recipients of organ transplants. *Transplantation.* 2011;92(7):829-835.
30. Carter V, Shenton BK, Jaques B, et al. Vimentin antibodies: a non-HLA antibody as a potential risk factor in renal transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37(2):654-657.
31. Joosten SA, Sijpkens YW, van Ham V, et al. Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant.* 2005;5(2):383-393.
32. Porcheray F, Fraser JW, Gao B, et al. Polyreactive antibodies developing amidst humoral rejection of human kidney grafts bind apoptotic cells and activate complement. *Am J Transplant.* 2013;13(10):2590-2600.
33. Cardinal H, Dieude M, Brassard N, et al. Antiperlecan antibodies are novel accelerators of immune-mediated vascular injury. *Am J Transplant.* 2013;13(4):861-874.
34. Carter V, Howell WM. Vimentin antibody production in transplant patients and immunomodulatory effects of vimentin in vitro. *Hum Immunol.* 2013;74(11):1463-1469.

IV. DISCUSIÓN

GENERAL

La evolución del trasplante renal depende de una gran variedad de factores, entre los que se encuentra la presencia de anticuerpos frente a antígenos expresados en el órgano del donante. La compatibilidad del grupo sanguíneo ABO y HLA entre el donante y el receptor no es suficiente para evitar el desarrollo de respuestas inmunológicas, por lo que deben existir otros polimorfismos que den lugar al alorreconocimiento (57). Las células endoteliales de los vasos sanguíneos en el injerto suponen la primera barrera a la que se enfrenta el sistema inmunológico del receptor, de modo que los antígenos allí expresados quedan continuamente sometidos al proceso de inmunovigilancia. La expresión de antígenos nuevos puede estar inducida por la propia cirugía del trasplante, que produce daño endotelial por isquemia-reperfusión, desestabilizando el equilibrio inflamatorio y provocando estrés celular. En este contexto, las proteínas MICA son las principales dianas no-HLA de los anticuerpos, ya que aumentan su expresión sobre la superficie endotelial y son altamente polimórficas. No obstante, se han descrito otros antígenos endoteliales de menor variabilidad que también podrían ser diana de respuestas inmunológicas. Nuestro estudio se centra en el efecto de los anticuerpos anti-MICA y AECA sobre la evolución del trasplante renal.

1. Sensibilización pre-trasplante: los mecanismos clásicos de sensibilización a HLA no se asocian con la presencia de anticuerpos anti-MICA o AECA preformados.

Los mecanismos que sensibilizan a receptores renales frente a dianas no-HLA antes del trasplante son mal conocidos. En nuestra población de 727 receptores renales, el 7,15% de pacientes en lista de espera presentaron anticuerpos anti-MICA preformados. Este porcentaje es menor al descrito en otras cohortes, donde el rango

varía desde el 11,4% al 24,7%. El mayor porcentaje (24,7%) es el encontrado por el grupo de Zou y colaboradores (122) en una población de 85 pacientes en lista de espera de trasplante renal. En una cohorte de 40 receptores de órganos procedentes de donante vivo, Solgi *et al.* (123) encontraron que el 20% presentaban anticuerpos anti-MICA en el suero pre-trasplante. En los estudios con cohortes más amplias, el porcentaje de sensibilización frente a antígenos MICA previa al trasplante decrece hasta el 14,9% en 597 pacientes con ERC (124) o el 11,4% en 1910 receptores renales (78). Estas diferencias no son atribuibles a la técnica empleada, ya que en todos estos sueros se detectaron los anticuerpos mediante ensayos en fase sólida. Sin embargo, existen diferencias en cuanto al protocolo, los reactivos, el software de interpretación, los puntos de corte y/o el número de especificidades testadas en cada caso. Además, las poblaciones de pacientes en lista de espera presentan distintas características epidemiológicas con respecto a la edad o el sexo, la enfermedad de base o a la recepción de un primer trasplante o trasplantes sucesivos. Todo ello podría explicar la variabilidad de estos resultados.

Al contrario de lo observado por otros autores, en nuestra población no encontramos diferencias significativas entre los pacientes con o sin anticuerpos anti-MICA preformados en relación con los eventos clásicos de sensibilización, como segundos trasplantes y sucesivos, transfusiones o los posibles embarazos. Lemy y colaboradores (124) mostraron que las transfusiones, los embarazos y los trasplantes previos suponen mayor riesgo de sensibilización frente a MICA. En nuestro estudio, no disponemos de la información relativa a las transfusiones recibidas, si bien el intervalo temporal en que se produjeron los trasplantes en nuestra cohorte (2005-2011) nos hace pensar que el porcentaje de pacientes transfundidos es, probablemente, mucho

más bajo que en la cohorte de Lemy *et al.*, que incluyó receptores desde 1990, cuando las transfusiones de pacientes en la lista de espera era una práctica mucho más habitual. Además, al tratarse de una molécula que no se expresa en linfocitos, las únicas células sanguíneas que podrían inducir inmunización anti-MICA serían los monocitos, que únicamente suponen un 2-8% del total de células en sangre periférica. Otra diferencia fundamental con Lemy *et al.* es que en nuestro estudio consideramos el sexo femenino como variable subrogada de embarazo, mientras que en su trabajo se recoge el número real de embarazos previos. La sensibilización frente a MICA durante el embarazo parece probable, ya que se ha demostrado que esta proteína se expresa en el sincitiotrofoblasto de la placenta (197), generalmente en su forma soluble, para reducir la cantidad de receptores NKG2D activadores en la superficie de los linfocitos NK de la madre.

Al igual que nosotros, otros grupos tampoco han encontrado diferencias en la sensibilización frente a MICA en individuos retrasplantados o en función del sexo del receptor (122). Sin embargo, aunque nuestros resultados no muestran asociación entre la inmunización frente a HLA y MICA, lo cual refuerza la hipótesis de que la sensibilización frente a MICA antes del trasplante se debe a mecanismos diferentes a los que sensibilizan frente a HLA, sí observamos un mayor porcentaje de individuos doblemente inmunizados en el grupo MICA+, previamente descrito por otros autores (123, 124). Dado que MICA es una proteína inducida por estrés celular y la prevalencia de infección por CMV es elevada en pacientes en espera de un trasplante renal, analizamos si la infección por CMV, que induce la expresión de MICA en la membrana de la célula infectada, podría asociarse con la sensibilización. Aunque se encontró un

mayor porcentaje de individuos CMV+ en el grupo MICA+, la asociación no llegó a alcanzar significación estadística.

En nuestro estudio, el 12% de los receptores presentan AECA preformados (n=39), un porcentaje similar al observado por otros autores en trasplante cardíaco (13%) (198) y ligeramente menor al descrito en trasplante renal (15.8-24%) (69, 145, 155, 160). El mayor porcentaje encontrado por estos autores podría deberse a que emplean una dilución 1/10 de cribado, diferente a la que nosotros establecemos (1/100) siguiendo las instrucciones del fabricante. En nuestra población no encontramos asociación entre el desarrollo de AECA preformados y los mecanismos clásicos de inmunización frente a antígenos HLA. Sin embargo, sí observamos que en el grupo de pacientes con AECA preformados hay más mujeres que en el grupo de pacientes sin AECA o con AECA *de novo*, aunque las diferencias no llegan a ser significativas. Sun y colaboradores (70) también encuentran una mayor frecuencia de mujeres AECA+, pero no comparan el sexo del receptor cuando dividen la población en AECA preformados y *de novo*. Por el contrario, Jackson *et al.* (145) y Xavier *et al.* (149) describen una mayor prevalencia de AECA en hombres, aunque no diferencian entre AECA preformados y *de novo*, si no que comparan los grupos ECXM+ vs. ECXM- o AECA+ vs. AECA-, respectivamente.

Shin y colaboradores (199) encontraron una relación entre el título de AECA y la HD, que no ha sido confirmada por otros estudios. Sin embargo, el desarrollo de AECA pre-trasplante tampoco parece estar relacionado con la diálisis en nuestra población, ya que la proporción de pacientes con AECA preformados en situación de HD o DP es igual o menor que en el resto de grupos de pacientes (AECA- y AECA *de novo*), sin que

las diferencias lleguen a ser significativas. Globalmente, aquellos individuos que no recibieron DP acumularon el 86% de los eventos de rechazo. Es destacable el porcentaje de pacientes AECA *de novo* en ese grupo.

2. La presencia de anticuerpos anti-MICA preformados se asocia a una peor evolución del trasplante y el desarrollo de AECA *de novo* a una mayor tasa de rechazo

Nuestro principal hallazgo es que la presencia de anticuerpos anti-MICA preformados en el suero de pacientes que reciben un trasplante renal aumenta el riesgo de rechazo del injerto. La diferencia fundamental entre el diseño de nuestro estudio y estudios previos es que nuestra cohorte se categorizó en grupos en función de la presencia o ausencia de anticuerpos anti-HLA (HLA+MICA+, HLA-MICA-, HLA+MICA- y HLA-MICA+), lo que permitió analizar el papel de los anticuerpos anti-MICA de forma independiente de los anticuerpos anti-HLA. Nuestros resultados confirman lo publicado por Zou *et al.* en 1910 receptores renales (78), aunque las poblaciones de partida difieren significativamente en cuanto al tratamiento de inducción, al número de pacientes tratados con CsA y al uso de antiproliferativos como el MMF. La técnica de detección de anticuerpos anti-MICA es también un ensayo basado en microesferas, pero en su estudio se detectan únicamente 5 antígenos MICA y la interpretación de sus resultados se basa en una puntuación relativa al control sano. Estos autores demuestran que la presencia de anticuerpos anti-MICA preformados reduce la supervivencia del injerto y que este efecto es más significativo cuando el análisis se limita a pacientes con 0% PRA. En nuestro análisis, realizamos una segunda clasificación de pacientes en función del PRA (PRA+MICA+, PRA-MICA-,

PRA+MICA- y PRA-MICA+) y también encontramos diferencias significativas en cuanto a la pérdida del trasplante e incidencia de eventos de rechazo, que fue superior en ambos casos dentro del grupo PRA+MICA+.

En nuestra cohorte, el efecto de los anticuerpos anti-MICA preformados sobre la tasa de rechazo es significativo durante los primeros tres meses post-trasplante, mientras que al cabo de dos años, las diferencias se atribuyen al estatus PRA. Esto coincidiría con el hecho de que el daño isquemia-reperfusión induce la expresión de MICA en el endotelio del injerto durante el primer periodo post-trasplante, mientras que, posteriormente, una vez superada esta primera fase y cuando el órgano está funcionalmente más estable, serán los anticuerpos anti-HLA los que seguirán reconociendo sus dianas en el órgano trasplantado.

En los receptores PRA+ con especificidades conocidas, el tipaje de su donante nunca presentará un alelo HLA frente al que se haya detectado reactividad (estos donantes se habrían excluido por dar prueba cruzada positiva), por lo que el posible efecto de los anticuerpos anti-HLA citotóxicos en el riñón trasplantado no sería atribuible a DSA. En nuestra cohorte, el paciente PRA+MICA+ que experimenta un episodio de rechazo en la primera semana post-trasplante recibe su primer trasplante teniendo un 20% de PRA frente a las especificidades HLA-B38 y HLA-B51. El tipaje de su donante es HLA-B35, HLA-B44 y en su informe se determina que no hay aumento de los anticuerpos anti-HLA después del trasplante. En la primera semana después de recibir el injerto, el paciente pierde el riñón trasplantado por una trombosis venosa de posible origen inmunológico que, en vista de los datos anteriores, podría atribuirse a la presencia de anticuerpos anti-MICA preformados. Esto coincide con la observación realizada por

Mizutani y colaboradores (133), quienes demuestran que los anticuerpos anti-HLA y anti-MICA promueven la coagulación y consiguiente trombosis en los casos de rechazo hiperagudo. Por otro lado, observamos que en los dos receptores PRA-MICA+ con rechazo, éste se produce más tardíamente y se observa un componente celular o una discreta positividad C4d, respectivamente. Nuestra limitación fundamental es que no podemos definir si el efecto observado podría haber sido causado por anticuerpos anti-HLA preformados no-DSA, pues también pueden estar implicados en el rechazo agudo del injerto (200, 201). Otra limitación es que no conocemos el tipaje MICA de todos los donantes de nuestra cohorte, por lo que en la mayoría de los casos no sabemos si los anticuerpos del receptor están dirigidos o no de forma específica frente a la proteína MICA del donante (75, 80).

Para poder demostrar que el efecto de los anticuerpos anti-MICA es independiente de otras variables relacionadas con la mayor incidencia de rechazo, realizamos un estudio multivariante clasificando a los pacientes de acuerdo con la presencia de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA, en lugar de clasificarlos de acuerdo con el % PRA y la presencia de anticuerpos anti-MICA, pues el estudio de anticuerpos anti-HLA por ensayos de fase sólida es más sensible y detecta tanto anticuerpos citotóxicos como no citotóxicos. Mediante este análisis, se confirman los resultados del estudio de supervivencia y obtenemos que, en nuestra población, el grupo HLA-MICA+ presenta 5 veces más riesgo de sufrir un evento de rechazo en los 3 primeros meses post-trasplante que el grupo HLA-MICA-, independientemente de otras variables como %PRA y el sexo femenino del donante. Resulta interesante comprobar cómo este efecto se diluye en meses posteriores, en los que, por el contrario, la presencia de anticuerpos anti-HLA conserva una odds ratio (OR) superior a 1. Aunque no hemos

analizado más exhaustivamente el significado de nuestra observación relacionada con el sexo del donante, pero concuerda con la peor evolución del trasplante descrita en riñones procedentes de mujeres donantes (202). Si esta asociación se debe a diferencias en los antígenos menores de histocompatibilidad codificados por genes localizados en los cromosomas sexuales o a un efecto del número de nefronas funcionantes en riñones de distinto sexo requiere futuras investigaciones.

Para definir el significado de los AECA post-trasplante, eliminamos de la cohorte aquellos receptores que presentaban anticuerpos anti-HLA y/o anti-MICA antes y/o después del trasplante, además de 10 receptores AECA+ que resultaron AT1R+ (203). De este modo, podemos asegurar que el efecto observado es únicamente atribuible a estos anticuerpos anti-endotelio. En nuestra cohorte, el desarrollo de AECA *de novo* parece estar asociado al tratamiento inmunosupresor. El inhibidor de calcineurina más utilizado entre los receptores renales de nuestra población es el TAC, con sólo 4 receptores tratados con CsA. Sin embargo, resulta llamativo que 2 de esos 4 pacientes desarrollaron AECA *de novo*. Esto concuerda con la citotoxicidad descrita previamente para este fármaco y con los datos que muestran que la CsA incrementa los niveles de células endoteliales circulantes (204) y de anticuerpos anti-vimentina (205). No obstante, el escaso número de individuos tratados con CsA en nuestro estudio impide una mayor comparativa y nuestros resultados no se ven replicados por otros autores (70).

Nuestro principal hallazgo es el incremento de la incidencia de la tasa de rechazo en el grupo AECA+, que se demostró exclusivamente asociado a la presencia de AECA *de novo* en suero y no a los preformados. Esto confirma los resultados de otros grupos

(70) y abre un marco interesante de discusión, ya que pese a que en principio se trata de autoanticuerpos, es decir, de anticuerpos frente a dianas antigénicas no alogénicas, los AECA aparecen en el contexto de la alorrespuesta y, por tanto, en relación con los mecanismos tendentes al rechazo del órgano trasplantado.

Mediante el estudio multivariante de nuestra población descartamos que la relación observada entre los AECA *de novo* y el rechazo del injerto sea debida a otras variables asociadas que pudieran sesgar el resultado. Se encontró que la edad de los receptores influye en el desarrollo del rechazo, siendo significativamente menor el riesgo en los pacientes que se encuentran entre 36-70 años y superior en pacientes mayores y población pediátrica, en concordancia con otras series (28, 167). El menor tiempo de diálisis relacionado con el rechazo queda en el límite de la significación estadística, si bien existe un aumento del p-valor en el paso del estudio univariante al multivariante. Lo contrario sucede con el sexo femenino del donante, que pasa de un p-valor no significativo en el análisis univariante a quedarse en el límite de la significación estadística en el multivariante. No obstante, la presencia de AECA *de novo* permanece como la variable de mayor riesgo y mayor asociación estadística con los eventos de rechazo.

3. Los grupos PRA+MICA+ y AECA+ *de novo* presentan peor función renal en las primeras semanas post-trasplante

En línea con los resultados anteriores, cabe esperar que aquellos grupos en que hemos encontrado una peor evolución del trasplante sean los que presentan una peor función renal en el post-trasplante inmediato. En nuestro estudio, esto se evaluó

mediante tres parámetros: concentración de creatinina en suero, TFG y días en alcanzar niveles óptimos de creatinina.

Puesto que habíamos demostrado que los pacientes PRA+MICA+ presentaron más eventos de rechazo y pérdida del injerto en los tres primeros meses después de recibir el trasplante renal, quisimos confirmar este resultado, comparando la función renal a los tres meses en los cuatro grupos, clasificados en función del estatus PRA/MICA (PRA+MICA+, PRA-MICA-, PRA+MICA- y PRA-MICA+). En línea con nuestro hallazgo previo, los receptores PRA+MICA+ presentaron la menor TFG y tardaron un mayor tiempo en alcanzar niveles óptimos de creatinina post-trasplante. Sin embargo, el grupo PRA+MICA- conservó mejor la función renal en los primeros tres meses post-trasplante, comparado con el resto. Esto se podría explicar porque este grupo de pacientes contiene receptores hiperinmunizados que reciben, por tanto, dosis superiores de inmunosupresores y terapia de inducción. Curiosamente, el grupo PRA+MICA+ evoluciona peor durante el primer período post-trasplante, aun tratándose igualmente de pacientes hipersensibilizados, lo que refuerza el concepto del papel deletéreo e independiente de los anticuerpos anti-MICA. Las gráficas de porcentaje de rechazo muestran cómo los pacientes PRA+MICA+ evolucionan peor en las primeras semanas post-trasplante mientras que el grupo PRA+MICA- tiene una buena evolución durante el primer año post-trasplante y después empieza a acumular un mayor porcentaje de eventos de rechazo, quizás también influido por la propia nefrotoxicidad de los fármacos administrados.

Finalmente, analizamos la relación entre el estatus de inmunización del receptor y el desarrollo del estadio CKD5T (pacientes trasplantados en situación de IRC o estadio

5 de la ERC). Como cabía esperar, el grupo PRA+MICA+ presenta de nuevo el mayor riesgo, independientemente de otras covariables significativamente asociadas con el desarrollo del estadio CKD5T, como la edad del donante. El trasplante de órganos procedentes de donantes mayores se ha relacionado con la necesidad de re-trasplante en estudios previos (206). De nuevo, la principal limitación de nuestros resultados es el pequeño tamaño muestral del grupo PRA+MICA+, por lo que sería interesante realizar futuros estudios en una cohorte mayor de pacientes doblemente inmunizados para poder confirmar estas observaciones.

En cuanto a AECA, de la comparación de los niveles séricos de creatinina a diferentes tiempos post-trasplante observamos que, en la primera semana, el grupo de pacientes con AECA *de novo* presenta peor función renal que los grupos AECA- y AECA preformados, mientras que a tiempos posteriores estas diferencias desaparecieron. El desarrollo de cualquier respuesta inmunológica adaptativa requiere de al menos una semana, por lo que la peor función del injerto los primeros días post-trasplante en el grupo de pacientes con AECA *de novo* sería difícilmente atribuible al efecto deletéreo de estos anticuerpos, aun en los pacientes en los que se hubieran detectado de forma muy precoz. Nuestra hipótesis sostiene que factores como el daño por isquemia-reperfusión, la inflamación o la respuesta inmunológica innata, entre otras, serían responsables del daño endotelial y una mala función del injerto en estadios tempranos (16). Estos eventos no estarían causados por los AECA, sino más bien al contrario, los anticuerpos aparecerían como consecuencia de la citotoxicidad y la liberación de antígenos de las células endoteliales del injerto al torrente sanguíneo y la sensibilización masiva del receptor. Esta secuencia de acontecimientos explicaría la

asociación epidemiológica encontrada entre la peor función temprana del injerto y la presencia de AECA *de novo* en el suero de esos receptores renales.

4. Los anticuerpos no-HLA son principalmente poliespecíficos: los anticuerpos anti-MICA reconocen dos supereplets y los AECA presentan 6 patrones diferentes por IFI

Para profundizar sobre el significado de los anticuerpos anti-MICA y AECA en el contexto del trasplante renal resulta importante conocer cómo se produce la unión a sus antígenos, qué especificidades reconocen y la localización de estas dianas, ya que determinará en gran parte el mecanismo por el cual pueden verse relacionados con la alorrespuesta.

En nuestra población, del 7,15% inicial de receptores MICA+ (n=52), 25 sueros fueron positivos para el estudio de especificidades MICA. Esta reducción en el número de positivos puede explicarse por la menor fuerza de unión al antígeno por parte de los anticuerpos preformados o porque el cribado se realiza con esferas cubiertas tanto de antígenos MICA como MICB, mientras que el estudio de especificidades se limita a MICA, de modo que al tratarse de un test más específico se pierde sensibilidad. También podría deberse al efecto de dilución por el aumento del número de microesferas en los ensayos de especificidades, ya que mientras que el cribado consta de 2 esferas, en el ensayo de especificidades existe un total de 11, cada una de ellas recubiertas con un solo tipo de antígeno MICA (207). Este efecto es especialmente importante si tenemos en cuenta que existe reacción cruzada entre los distintos alelos MICA, motivo por el cual se definen los dos supereplets o grupos de reactividad AYVE y CMGWS.

Clasificando los alelos de cada supereplet en función de los polimorfismos de repetición STR de la región transmembrana de la proteína MICA, encontramos que en AYVE se agrupan los alelos A5 (MICA*019), A5.1 (MICA*027, con la misma secuencia extracelular que MICA*008, por lo que se consideran equivalentes) y A6 (MICA*004 y MICA*009); mientras que en CMGWS encontramos A4 (MICA*001, MICA*007, MICA*012 y MICA*018) y A9 (MICA*002). Los alelos MICA*015 y MICA*017 del supereplet CMGWS son variantes truncadas. La inmunización más frecuente en individuos HLA-MICA+ es frente a MICA*001 y MICA*018 (A4), mientras que MICA*017 (truncado) es la diana más prevalente entre la población doblemente inmunizada, en concordancia con lo descrito por otros autores (131). Sin embargo, estos alelos no son los más frecuentes en la población caucásica, que generalmente presenta al menos un alelo MICA*027 (55%) y/o MICA*002 (13%). Por lo tanto, esto hace pensar que la inmunización frente a MICA corresponde fundamentalmente a receptores MICA*027 (AYVE) expuestos a alelos del supereplet CMGWS, lo que también explicaría el reducido porcentaje de pacientes sensibilizados frente a MICA que encontramos pre-trasplante. Por otra parte, la frecuencia con que se encuentran anticuerpos frente a MICA propio podría deberse a la elevada tasa de reacción cruzada entre los distintos alelos del mismo supereplet.

En cuanto al patrón de reactividad CMGWS, llama la atención que los alelos MICA*001, *012 y *018 presentaron reacción positiva simultáneamente en la mayoría de los individuos HLA-MICA+. Estas tres proteínas comparten el epítipo 24T (208) que, a su vez, se ha relacionado con la glicosilación y mayor expresión de la proteína en la superficie celular (107). Además, estos tres alelos comparten el mismo polimorfismo A4 en su región transmembrana (89). Es probable que, por todo ello, sean éstas las

especificidades más frecuentemente encontradas en receptores con anticuerpos anti-MICA preformados. Con respecto al supereplet AYVE, los anticuerpos dirigidos frente a él tiene una mayor intensidad de fluorescencia en pacientes doblemente inmunizados. Este resultado está en línea con los hallazgos previos de Tonerre y colaboradores (106), donde se demuestra que el polimorfismo A5.1 (MICA*027) es el más inmunogénico, en relación con la mayor expresión de este alelo en la superficie celular.

Las implicaciones funcionales de sMICA sobre la activación de las células NK y la densidad de MICA en la membrana endotelial son relevantes no sólo en los procesos de inmunización en los receptores, sino también en las respuestas que se desarrollarán después. El daño por isquemia-reperfusión tras la cirugía del trasplante aumenta la expresión de MICA en la superficie endotelial y, consecuentemente, se incrementan los niveles de sMICA en el suero. Por lo tanto, si el receptor presenta anticuerpos anti-MICA preformados, éstos podrían estar actuando a través de dos mecanismos: activando directamente la citotoxicidad celular (mediante CDC o ADCC) o bloqueando las moléculas de sMICA, con el consiguiente aumento del número de receptores NKG2D en la superficie de las células NK y TCD8+. En biopsias renales y sedimento urinario se ha demostrado un aumento en la expresión de NKG2D en relación con procesos de rechazo agudo y nefropatía crónica del injerto (209). Cualquiera de los dos mecanismos, o la concurrencia de ambos, podría explicar la relación entre la presencia de anticuerpos anti-MICA previos al trasplante y el rechazo del injerto.

Al igual que la respuesta frente a antígenos MICA parece ser predominantemente alogénica, la generación de AECA parece estar más relacionada con procesos de

autoinmunidad. La principal dificultad para determinar las especificidades que reconocen los AECA es su heterogeneidad y la gran variedad de dianas que pueden reconocer, en su mayor parte de bajo polimorfismo. Además, son múltiples las técnicas que se han empleado para su detección, haciendo difícil la comparación entre distintos estudios. En nuestro diseño experimental, elegimos la IFI en HUVEC porque se trata de una técnica cuyo procedimiento técnico es de baja complejidad y está disponible comercialmente para los laboratorios de asistencia a la inmunología del trasplante. Aunque no permite la identificación del antígeno diana, sí que facilita su localización en la célula endotelial, en función del patrón de inmunofluorescencia. Otros grupos que también han empleado este método sólo han descrito lo que en nuestro estudio denominamos patrón CDS (70, 156), que consta de un punteado discreto citoplasmático. Sin embargo, los antígenos distribuidos por los diferentes compartimentos de la célula endotelial son muchos y potencialmente muy diversos (142, 210, 211), lo cual no parece que concuerde con la identificación de un único patrón sobre HUVEC. Otra diferencia fundamental con estos estudios es la dilución inicial de cribado. En nuestro caso, trabajamos con la recomendada por el fabricante (1/100), mientras que Sun y colaboradores parten de una dilución 1/10.

En nuestra población, describimos 6 patrones IFI diferentes: anti-nuclear, anti-citoesqueleto, CDS, anti-mitocondrial, anti-Golgi y “rod and rings”. Curiosamente, podemos encontrar los 6 perfiles de IFI en AECA preformados, mientras que los AECA *de novo* sólo presentan los patrones anti-nuclear, anti-citoesqueleto y CDS. El hecho de que la mayor parte de la reactividad se dirija frente a dianas intracelulares parece reforzar la idea de que los procesos de sensibilización son posteriores a un daño endotelial previo, como explicaremos más adelante. No obstante, una vez generados

estos anticuerpos podrían también dañar el órgano trasplantado. En concordancia con esta idea, otros grupos han relacionado la presencia de anticuerpos anti-citoplasmáticos (84, 198, 212) o anti-nucleares (213, 214) con el desarrollo de los eventos de rechazo en trasplante cardíaco y renal.

5. Los anticuerpos no-HLA pueden ser causa (anticuerpos anti-MICA citotóxicos) o consecuencia (AECA frente a antígenos liberados tras el daño endotelial) del rechazo del trasplante

Uno de los principales mecanismos a través del cual los aloanticuerpos participan en la respuesta de rechazo es la activación de la vía clásica del complemento. Varios estudios han demostrado una peor evolución del injerto renal en pacientes que presentan anticuerpos anti-HLA fijadores de C1q (169, 171), pero nunca se había investigado antes si los anticuerpos anti-MICA preformados en el suero de receptores renales eran capaces de fijar complemento. En nuestra cohorte, analizamos la capacidad de unión de estos anticuerpos a C1q en un total de 13 sueros, que seleccionamos en función de la presencia de anticuerpos anti-MICA DSA (n=9) y anti-MICA no DSA con algún evento de rechazo y/o depósito de C4d confirmado por biopsia (n=4). De nuevo, observamos una reducción en el número de positivos (n=3 sueros C1q+). Esto puede deberse a que solamente estos tres sueros contienen inmunoglobulinas anti-MICA de isotipos fijadores de complemento en cantidades significativas o a que la prueba de C1q por Luminex requiere de títulos más altos para poder detectar un resultado positivo (173, 215). Jackson y colaboradores (69, 152) demostraron que en los sueros de pacientes sensibilizados frente a dianas endoteliales predominan los isotipos IgG2 e IgG4, no fijadores de complemento, lo cual apoya

nuestros resultados. Una limitación importante de nuestro análisis es que sólo detectamos anticuerpos el isotipo IgG. No obstante, otros autores han demostrado que el isotipo IgG está relacionado con mayor frecuencia al desarrollo de eventos de rechazo (77), por lo que proporcionalmente estaríamos considerando la mayoría de los anticuerpos asociados a la peor evolución del injerto. Sin embargo, tanto IgG como IgM se han relacionado con los eventos de rechazo (68), por lo que en futuros estudios, sería de interés la definición de los distintos isotipos y subclases de los anticuerpos anti-MICA preformados en el suero de receptores renales.

Por otra parte, resulta destacable la reducción de especificidades que observamos en el análisis de anticuerpos que fijan C1q, cuando lo comparamos con el ensayo LSA de detección de anticuerpos anti-MICA específicos. En este último, la mayoría de los sueros reacciona con más de un alelo MICA y, generalmente, los anticuerpos reconocen los dos supereplets CMGWS y AYVE. Sin embargo, en el ensayo de C1q, la reactividad queda confinada a uno de los grupos, aunque también puede existir reactividad frente a ambos. Cabe destacar que aquellas reactividades más frecuentemente encontradas por LSA (MICA*001, MICA*017 y MICA*018) no son las que presentan mayor intensidad en el estudio C1q (MICA*008/027 y MICA*002). En aquellos sueros en que reaccionan ambos supereplets, las especificidades con mayor intensidad son también distintas (MICA*012 y MICA*015). Las esferas empleadas en ambos test son las mismas, por lo que este efecto no se puede explicar por diferencias en la densidad de las proteínas MICA que las recubren. En el análisis de sueros post-trasplante (datos no publicados), también observamos que las especificidades MICA*008/027 y MICA*002 son las de mayor intensidad y el resto de reactividades quedan contenidas dentro de un solo eplet. En su publicación de 2009, Suárez-Álvarez

y colaboradores (27) describieron un total de 9 regiones lineales inmunodominantes de la proteína MICA, de las cuáles 3 presentan polimorfismos que pueden reaccionar con el suero de receptores renales con anticuerpos frente a ambos supereplets (regiones V y VIII) o a un supereplet individual (región VII). Teniendo esto en cuenta, probablemente el desarrollo de isotipos fijadores de C1q se deba al reconocimiento de epítomos en la región VII de la molécula MICA, es decir, frente a un solo supereplet. Los aminoácidos polimórficos de esa región se localizan en la zona de la plataforma $\alpha 1\text{-}\alpha 2$, que queda oculta cuando la molécula MICA se encuentra libre en la superficie celular (99). Por lo tanto, parece probable que inmunización que genera los isotipos fijadores de complemento se dé cuando la molécula MICA reconoce su receptor NKG2D, momento en el cual la plataforma queda expuesta, o en su forma soluble.

Además de la capacidad de unión a C1q, en este trabajo se demuestra que los anticuerpos anti-MICA preformados hallados en el suero de receptores renales no sólo reconocen los epítomos de la proteína artificialmente adherida a una esfera, sino que también son capaces de reconocer la proteína expresada de forma nativa en la superficie de células activadas o tumorales. Esto es importante, pues la activación de C1q inicia una cascada de activación de distintas proteínas del complemento que requieren de una superficie de unión para completar el proceso de muerte celular. Por ello, también se demuestra en este trabajo por primera vez que el suero de estos pacientes contiene anticuerpos anti-MICA preformados capaces de finalizar la cascada de citotoxicidad dependiente de complemento, lo cual se había demostrado solamente con anticuerpos anti-MICA post-trasplante en receptores renales (77, 175) o cardíacos (176), o mediante el empleo de anticuerpos monoclonales anti-MICA*008 generados en ratones (175). Aunque este mecanismo de activación de la vía clásica del

complemento parece ser el minoritario entre los anticuerpos anti-MICA preformados, no se debe olvidar que estos anticuerpos también presentan otro tipo de funciones, como se ha comentado anteriormente, que podrían estar contribuyendo al rechazo del injerto renal (94).

Por otra parte, se han propuesto diversos mecanismos a través de los cuales los AECA estarían directamente relacionados con el daño endotelial (142). Cuando las dianas antigénicas se expresan en la membrana de las células, la unión de estos anticuerpos podría tener un efecto directo, a través de la activación de las vías de señalización intracelular o del bloqueo de la función de la molécula que han reconocido. Sin embargo, la mayor parte de los antígenos endoteliales reconocidos por estos anticuerpos son intracelulares y de un polimorfismo más limitado. Esto lleva a pensar que estos antígenos podrían permanecer ocultos a las células B autorreactivas cuando la célula endotelial permanece intacta y que, en presencia de daño endotelial, su liberación al medio extracelular conllevaría su reconocimiento y la consiguiente formación de anticuerpos frente a antígenos citoplasmáticos y nucleares. Nuestra hipótesis se basa en este concepto, apoyado por el hecho de que son los AECA *de novo*, y no los preformados, los que aparecen relacionados con los eventos de rechazo del injerto. Los pacientes que desarrollan AECA *de novo* tienen los peores niveles de creatinina durante la primera semana post-trasplante y muestran RFI. Además, los rechazos en este grupo de pacientes no presentan una histología característica de rechazo humoral, ni son predominantemente C4d+, como cabría esperar si estuvieran causados por anticuerpos.

Una de las principales fortalezas de nuestro estudio consiste en que el efecto observado se puede atribuir exclusivamente a AECA, ya que se eliminaron para los análisis aquellos pacientes que presentaban anticuerpos anti-HLA, anti-MICA o anti-AT1R. Sin embargo, la principal limitación es que se trata de un estudio retrospectivo, en el cual las muestras post-trasplante fueron extraídas en algunos casos antes y en otros después del rechazo, por lo que no podemos establecer con total seguridad si los AECA que observamos después del rechazo existían o no antes del mismo. Ronda y colaboradores (150) estudiaron la presencia de AECA en 3 de 4 muestras pre-rechazo (2 resultaron claramente positivas y una presentó valores indeterminados), lo que apoyaría su posible papel causal. Los autores de este estudio demuestran que no hay AECA pre-trasplante en el suero de estos receptores, por lo que se trata de AECA que se han desarrollado *de novo* y podrían ser la causa del evento de rechazo. Sin embargo, que el desarrollo de estos anticuerpos haya sido previo al diagnóstico del rechazo no confirma que sean la causa del mismo, pues la confirmación por biopsia se indica en receptores que presentan clínica de rechazo, es decir, posteriormente a que se haya producido el daño endotelial, de manera que esos anticuerpos podrían ser igualmente una consecuencia de éste. Por otra parte, en nuestra cohorte las biopsias de los rechazos no presentaban depósitos de C4d. Aún así, es importante tener en cuenta que las técnicas de detección de C4d, que relacionan directamente el rechazo con los anticuerpos, son altamente específicas pero muy poco sensibles (193, 194, 216).

Por otra parte, la presencia de AECA se ha relacionado previamente con procesos de apoptosis, implicados en el desarrollo de respuesta autoinmunitarias (217). Gao y colaboradores (218) encontraron que los sueros pre-trasplante contenían mayores niveles de anticuerpos anti-células apoptóticas IgG que los controles sanos y que no

existía correlación con variables epidemiológicas como sexo, raza, enfermedad de origen, transfusiones o trasplantes previos. En el contexto del trasplante, se ha demostrado la inducción tanto de anticuerpos polirreactivos durante el desarrollo de rechazo mediado por anticuerpos (219), como de anticuerpos frente a dianas específicas como el perlecano o la agrina, después de la apoptosis de las células endoteliales (60, 72). Cada vez son más los estudios que confirman la inducción de procesos de autoinmunidad tras el desarrollo de las alorespuestas, con un importante efecto negativo sobre la evolución de los trasplantes (86, 220, 221).

En resumen, los anticuerpos frente a dianas antigénicas distintas al HLA tienen un papel importante en la evolución del injerto renal. Los anticuerpos anti-MICA preformados favorecen el rechazo del injerto y los AECA *de novo* parecen indicar procesos de daño endotelial previo. El estudio de estos anticuerpos en receptores parece, por lo tanto, útil para definir de forma más completa el estatus inmunológico del paciente, para identificar aquellos individuos con más riesgo y adoptar medidas preventivas o terapéuticas de mayor precisión. En este sentido, se podría postular la determinación de estos anticuerpos en el suero de receptores renales, por su utilidad como biomarcadores de pronóstico en el trasplante renal.

V. CONCLUSIONES

GENERALES

1. El desarrollo de anticuerpos anti-MICA pre-trasplante no se encuentra asociado a los eventos clásicos de inmunización frente a moléculas HLA, como trasplantes previos y embarazos, lo que sugiere que la sensibilización a antígenos MICA y HLA ocurre por mecanismos independientes. Tampoco existe asociación entre la generación de anticuerpos anti-MICA y el contacto previo con CMV, cuya presencia se asocia con un incremento en la expresión del antígeno MICA por parte de la célula infectada.
2. Durante los tres primeros meses post-trasplante, la coexistencia de anticuerpos anti-HLA y anti-MICA preformados aumenta la incidencia de eventos de rechazo y disminuye la supervivencia del injerto, sin que exista un impacto sobre la supervivencia del paciente. Los receptores doblemente inmunizados tardan un mayor tiempo en alcanzar niveles óptimos de creatinina en sangre y su TFG estimada es menor que en el resto. El estatus PRA+MICA+ se relaciona también con mayor riesgo de ERC en estadio 5, cuya gravedad suele implicar la necesidad de regresar a diálisis y el retrasplante.
3. La presencia de anticuerpos anti-MICA preformados confiere el mayor riesgo de rechazo del trasplante renal durante los tres primeros meses post-trasplante, de forma independiente a otras variables como el porcentaje PRA o el sexo del donante.
4. Los anticuerpos anti-MICA pre-trasplante son mayoritariamente poliespecíficos y muestran reacciones más fuertes cuando coexisten con anticuerpos anti-HLA. Los epítomos reconocidos por los anticuerpos anti-MICA se pueden clasificar en dos supereplets, AYVE y CGMWS, y suelen encontrarse reactividades frente a ambos en un mismo sujeto. Los anticuerpos anti-MICA asociados con anticuerpos anti-

HLA presentan reacciones más fuertes si reconocen el supereplet AYVE.

5. Los anticuerpos anti-MICA preformados son capaces de fijar la proteína C1q del complemento y pueden reconocer a un único supereplet o ambos. En el supereplet AYVE la especificidad que presenta la reacción más fuerte es MICA*027 (similar a MICA*008) y en CMGWS se trata de MICA*002.
6. Los anticuerpos anti-MICA presentes en el suero de pacientes antes de recibir un trasplante renal pueden reconocer la molécula MICA en condiciones nativas, expresada en las superficies celulares.
7. En ensayos *in vitro* de CDC similares a los realizados en las pruebas cruzadas para detectar anticuerpos anti-HLA citotóxicos, se demuestra que los anticuerpos anti-MICA preformados tienen capacidad citotóxica.
8. En nuestra cohorte de receptores renales sin anticuerpos anti-HLA, anti-MICA y anti-AT1R, la presencia de AECA *de novo* no afecta a la supervivencia del paciente y del injerto, pero sí aumenta el riesgo de padecer un evento de rechazo, cuando lo comparamos con el grupo que no ha desarrollado AECA post-trasplante. Por su parte, los AECA preformados no están asociados a la peor evolución del trasplante renal.
9. La presencia de AECA *de novo* confiere el mayor riesgo de rechazo del trasplante renal, de forma independiente a otras variables que aumentan el riesgo, como el sexo del receptor, o que lo disminuyen, como la edad del receptor entre los 36 y los 70 años.
10. Describimos seis patrones diferentes en pacientes con AECA preformados: anti-citoesqueleto, anti-nucleares, punteado discreto citoplasmático, similar al patrón anti-mitocondrial, anti-aparato de Golgi y similar a “rod and rings”. En individuos

con AECA *de novo*, solamente encontramos los tres primeros. Todos los pacientes con AECA *de novo* y episodios de rechazo presentaron los patrones anti-nuclear y anti-citoesqueleto. Estas especificidades podrían ser un marcador del daño endotelial asociado a la respuesta inmunológica frente al riñón trasplantado.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med.* 2003;139(2):137-47.
2. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.
3. Stevens PE, Levin A. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med.* 2013;158(11):825-30.
4. Sociedad Española de Nefrología. [Junio de 2016]; Disponible en: [http://www.senefro.org/modules.php?name=home\(=ES](http://www.senefro.org/modules.php?name=home(=ES).
5. European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association. [Junio de 2016]; Disponible en: <http://www.era-edta.org/>.
6. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2009;9 Suppl 3:S1-155.
7. Singhal R, Hux JE, Alibhai SM, Oliver MJ. Inadequate predialysis care and mortality after initiation of renal replacement therapy. *Kidney Int.* 2014;86(2):399-406.
8. Heaf JG, Lokkegaard H, Madsen M. Initial survival advantage of peritoneal dialysis relative to haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17(1):112-7.
9. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, O'Dea R, Murray DC, et al. Mode of dialysis therapy and mortality in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(2):267-76.
10. Martín P, Errasti P. Trasplante renal. *An Sist Sanit Navar.* 2006;29 Suppl 2:79-91.
11. Organización Nacional de Trasplantes. [Junio de 2016]; Disponible en: <http://www.ont.es>.

- 12.** Ponticelli CE. The impact of cold ischemia time on renal transplant outcome. *Kidney Int.* 2015;87(2):272-5.
- 13.** van der Vliet JA, Warle MC. The need to reduce cold ischemia time in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2013;18(2):174-8.
- 14.** Jochmans I, O'Callaghan JM, Pirenne J, Ploeg RJ. Hypothermic machine perfusion of kidneys retrieved from standard and high-risk donors. *Transpl Int.* 2015;28(6):665-76.
- 15.** Latchana N, Peck JR, Whitson BA, Henry ML, Elkhammas EA, Black SM. Preservation solutions used during abdominal transplantation: Current status and outcomes. *World J Transplant.* 2015;5(4):154-64.
- 16.** Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant.* 2011;11(11):2279-96.
- 17.** Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet.* 2004;364(9447):1814-27.
- 18.** Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Jr., Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(3):1039-47.
- 19.** Butler JA, Roderick P, Mullee M, Mason JC, Peveler RC. Frequency and impact of nonadherence to immunosuppressants after renal transplantation: a systematic review. *Transplantation.* 2004;77(5):769-76.
- 20.** Baek CH, Yang WS, Park KS, Han DJ, Park JB, Park SK. Infectious risks and optimal strength of maintenance immunosuppressants in rituximab-treated kidney transplantation. *Nephron Extra.* 2012;2(1):66-75.
- 21.** Kapoor A. Malignancy in kidney transplant recipients. *Drugs.* 2008;68 Suppl 1:11-9.

- 22.** van Gelder T, van Schaik RH, Hesselink DA. Pharmacogenetics and immunosuppressive drugs in solid organ transplantation. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(12):725-31.
- 23.** Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant.* 2014;14(2):272-83.
- 24.** Asgari E, Zhou W, Sacks S. Complement in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(4):486-91.
- 25.** Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(4):1046-56.
- 26.** Murphy SP, Porrett PM, Turka LA. Innate immunity in transplant tolerance and rejection. *Immunol Rev.* 2011;241(1):39-48.
- 27.** Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Baltar JM, Ortega F, Lopez-Larrea C. Potential role of NKG2D and its ligands in organ transplantation: new target for immunointervention. *Am J Transplant.* 2009;9(2):251-7.
- 28.** Lufft V, Tusch G, Offner G, Brunkhorst R. Kidney transplantation in children: impact of young recipient age on graft survival. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(10):2141-6.
- 29.** Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:225-74.
- 30.** Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med.* 2010;363(15):1451-62.
- 31.** Sacks SH, Zhou W. The role of complement in the early immune response to transplantation. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(6):431-42.
- 32.** Farrar CA, Zhou W, Lin T, Sacks SH. Local extravascular pool of C3 is a determinant of postischemic acute renal failure. *FASEB J.* 2006;20(2):217-26.

- 33.** Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med.* 2002;8(6):582-7.
- 34.** Billingham RE, Medawar PB. The Technique of Free Skin Grafting in Mammals. *Journal of Experimental Biology.* 1951;28(3):385-402.
- 35.** Gorer PA. The antigenic basis of tumour transplantation. *The Journal of Pathology and Bacteriology.* 1938;47(2):231-52.
- 36.** Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(10):807-17.
- 37.** Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant.* 2012;12(2):388-99.
- 38.** Valenzuela NM, Reed EF. Antibodies in transplantation: the effects of HLA and non-HLA antibody binding and mechanisms of injury. *Methods Mol Biol.* 2013;1034:41-70.
- 39.** Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002;11(6):609-18.
- 40.** Hirohashi T, Uehara S, Chase CM, DellaPelle P, Madsen JC, Russell PS, et al. Complement independent antibody-mediated endarteritis and transplant arteriopathy in mice. *Am J Transplant.* 2010;10(3):510-7.
- 41.** Loupy A, Suberbielle-Boissel C, Hill GS, Lefaucheur C, Anglicheau D, Zuber J, et al. Outcome of subclinical antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies. *Am J Transplant.* 2009;9(11):2561-70.
- 42.** Pouliquen E, Koenig A, Chen CC, Sicard A, Rabeyrin M, Morelon E, et al. Recent advances in renal transplantation: antibody-mediated rejection takes center stage. *F1000Prime Rep.* 2015;7:51.

- 43.** Terasaki P, Mizutani K. Antibody mediated rejection: update 2006. Clin J Am Soc Nephrol. 2006;1(3):400-3.
- 44.** Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. Am J Transplant. 2003;3(6):665-73.
- 45.** Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, et al. Gene map of the extended human MHC. Nat Rev Genet. 2004;5(12):889-99.
- 46.** Hidalgo LG, Campbell PM, Sis B, Einecke G, Mengel M, Chang J, et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. Am J Transplant. 2009;9(11):2532-41.
- 47.** Akalin E, Pascual M. Sensitization after kidney transplantation. Clin J Am Soc Nephrol. 2006;1(3):433-40.
- 48.** Duquesnoy RJ. HLA Matchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. Hum Immunol. 2002;63(5):339-52.
- 49.** HLA Matchmaker. [Junio de 2016]; Disponible en: www.hlamatchmaker.net.
- 50.** Duquesnoy RJ. A structurally based approach to determine HLA compatibility at the humoral immune level. Hum Immunol. 2006;67(11):847-62.
- 51.** Duquesnoy RJ. Humoral alloimmunity in transplantation: relevance of HLA epitope antigenicity and immunogenicity. Front Immunol. 2011;2:59.
- 52.** Claas FH, Dankers MK, Oudshoorn M, van Rood JJ, Mulder A, Roelen DL, et al. Differential immunogenicity of HLA mismatches in clinical transplantation. Transpl Immunol. 2005;14(3-4):187-91.
- 53.** HLA Epitope Registry. [Junio de 2016]; Disponible en: <http://epregistry.ufpi.br/index/index>.

- 54.** Loupy A, Hill GS, Jordan SC. The impact of donor-specific anti-HLA antibodies on late kidney allograft failure. *Nat Rev Nephrol.* 2012;8(6):348-57.
- 55.** Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(8):1398-406.
- 56.** Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation.* 2002;74(8):1192-4.
- 57.** Opelz G. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet.* 2005;365(9470):1570-6.
- 58.** Ozawa M, Rebellato LM, Terasaki PI, Tong A, Briley KP, Catrou P, et al. Longitudinal testing of 266 renal allograft patients for HLA and MICA antibodies: Greenville experience. *Clin Transpl.* 2006:265-90.
- 59.** Thomas KA, Valenzuela NM, Reed EF. The perfect storm: HLA antibodies, complement, FcγRs, and endothelium in transplant rejection. *Trends Mol Med.* 2015;21(5):319-29.
- 60.** Joosten SA, Sijpkens YW, van Ham V, Trouw LA, van der Vlag J, van den Heuvel B, et al. Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant.* 2005;5(2):383-93.
- 61.** Li L, Sigdel T, Vitalone M, Lee SH, Sarwal M. Differential immunogenicity and clinical relevance of kidney compartment specific antigens after renal transplantation. *J Proteome Res.* 2010;9(12):6715-21.
- 62.** Qin Z, Zou Y, Lavingia B, Stastny P. Identification of endothelial cell surface antigens encoded by genes other than HLA. A combined immunoprecipitation and proteomic

approach for the identification of antigens recognized by antibodies against endothelial cells in transplant recipients. *Hum Immunol.* 2013;74(11):1445-52.

63. Li L, Wadia P, Chen R, Kambham N, Naesens M, Sigdel TK, et al. Identifying compartment-specific non-HLA targets after renal transplantation by integrating transcriptome and "antibodyome" measures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(11):4148-53.

64. Dragun D, Muller DN, Brasen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelha M, Dechend R, et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med.* 2005;352(6):558-69.

65. Giral M, Foucher Y, Dufay A, Van Huyen JP, Renaudin K, Moreau A, et al. Pretransplant sensitization against angiotensin II type 1 receptor is a risk factor for acute rejection and graft loss. *Am J Transplant.* 2013;13(10):2567-76.

66. Dehan P, Van den Heuvel LP, Smeets HJ, Tryggvason K, Foidart JM. Identification of post-transplant anti-alpha 5 (IV) collagen alloantibodies in X-linked Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11(10):1983-8.

67. Lerut E, Van Damme B, Noizat-Pirenne F, Emonds MP, Rouger P, Vanrenterghem Y, et al. Duffy and Kidd blood group antigens: minor histocompatibility antigens involved in renal allograft rejection? *Transfusion.* 2007;47(1):28-40.

68. Breimer ME, Rydberg L, Jackson AM, Lucas DP, Zachary AA, Melancon JK, et al. Multicenter evaluation of a novel endothelial cell crossmatch test in kidney transplantation. *Transplantation.* 2009;87(4):549-56.

69. Jackson AM, Lucas DP, Melancon JK, Desai NM. Clinical relevance and IgG subclass determination of non-HLA antibodies identified using endothelial cell precursors isolated from donor blood. *Transplantation.* 2011;92(1):54-60.

- 70.** Sun Q, Cheng Z, Cheng D, Chen J, Ji S, Wen J, et al. De novo development of circulating anti-endothelial cell antibodies rather than pre-existing antibodies is associated with post-transplant allograft rejection. *Kidney Int.* 2011;79(6):655-62.
- 71.** Soulez M, Pilon EA, Dieude M, Cardinal H, Brassard N, Qi S, et al. The perlecan fragment LG3 is a novel regulator of obliterative remodeling associated with allograft vascular rejection. *Circ Res.* 2012;110(1):94-104.
- 72.** Cardinal H, Dieude M, Brassard N, Qi S, Patey N, Soulez M, et al. Antiperlecan antibodies are novel accelerators of immune-mediated vascular injury. *Am J Transplant.* 2013;13(4):861-74.
- 73.** Sigdel TK, Sarwal MM. Moving beyond HLA: a review of nHLA antibodies in organ transplantation. *Hum Immunol.* 2013;74(11):1486-90.
- 74.** Aguilera I, Alvarez-Marquez A, Gentil MA, Fernandez-Alonso J, Fijo J, Saez C, et al. Anti-glutathione S-transferase T1 antibody-mediated rejection in C4d-positive renal allograft recipients. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(7):2393-8.
- 75.** Alvarez-Marquez A, Aguilera I, Gentil MA, Caro JL, Bernal G, Fernandez Alonso J, et al. Donor-specific antibodies against HLA, MICA, and GSTT1 in patients with allograft rejection and C4d deposition in renal biopsies. *Transplantation.* 2009;87(1):94-9.
- 76.** Zwirner NW, Marcos CY, Mirbaha F, Zou Y, Stastny P. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum Immunol.* 2000;61(9):917-24.
- 77.** Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE, Holgersson J, Soderstrom K. Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation.* 2002;74(2):268-77.

- 78.** Zou Y, Stastny P, Susal C, Dohler B, Opelz G. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *N Engl J Med.* 2007;357(13):1293-300.
- 79.** Li L, Chen A, Chaudhuri A, Kambham N, Sigdel T, Chen R, et al. Compartmental localization and clinical relevance of MICA antibodies after renal transplantation. *Transplantation.* 2010;89(3):312-9.
- 80.** Narayan S, Tsai EW, Zhang Q, Wallace WD, Reed EF, Ettenger RB. Acute rejection associated with donor-specific anti-MICA antibody in a highly sensitized pediatric renal transplant recipient. *Pediatr Transplant.* 2011;15(1):E1-7.
- 81.** Chaudhuri A, Ozawa M, Everly MJ, Ettenger R, Dharnidharka V, Benfield M, et al. The clinical impact of humoral immunity in pediatric renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(4):655-64.
- 82.** Dinavahi R, George A, Tretin A, Akalin E, Ames S, Bromberg JS, et al. Antibodies reactive to non-HLA antigens in transplant glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(6):1168-78.
- 83.** Sutherland SM, Li L, Sigdel TK, Wadia PP, Miklos DB, Butte AJ, et al. Protein microarrays identify antibodies to protein kinase C ζ that are associated with a greater risk of allograft loss in pediatric renal transplant recipients. *Kidney Int.* 2009;76(12):1277-83.
- 84.** Carter V, Shenton BK, Jaques B, Turner D, Talbot D, Gupta A, et al. Vimentin antibodies: a non-HLA antibody as a potential risk factor in renal transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37(2):654-7.
- 85.** Stastny P. Introduction: What we know about antibodies produced by transplant recipients against donor antigens not encoded by HLA genes. *Hum Immunol.* 2013;74(11):1421-4.

- 86.** Angaswamy N, Tiriveedhi V, Sarma NJ, Subramanian V, Klein C, Wellen J, et al. Interplay between immune responses to HLA and non-HLA self-antigens in allograft rejection. *Hum Immunol.* 2013;74(11):1478-85.
- 87.** Leelayuwat C, Townend DC, Degli-Esposti MA, Abraham LJ, Dawkins RL. A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics.* 1994;40(5):339-51.
- 88.** Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(14):6259-63.
- 89.** Kirijas M, Spiroski M. MICA Polymorphism, Association with Diseases and the Role of Anti-MICA Antibodies in Organ and Stem Cell Transplantation. *Macedonian Journal of Medical Sciences.* 2013;6(3):1-11.
- 90.** Bahram S. MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol.* 2000;76:1-60.
- 91.** HLA Nomenclature. [Junio de 2016]; Disponible en: <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>.
- 92.** Tonnerre P, Gerard N, Chatelais M, Charreau B. MICA gene polymorphism in kidney allografts and possible impact of functionally relevant variants. *Transplant Proc.* 2010;42(10):4318-21.
- 93.** Cox ST, Madrigal JA, Saudemont A. Diversity and characterization of polymorphic 5' promoter haplotypes of MICA and MICB genes. *Tissue Antigens.* 2014;84(3):293-303.
- 94.** Zwirner NW, Fuertes MB, Girart MV, Domaica CI, Rossi LE. Immunobiology of the human MHC class I chain-related gene A (MICA): from transplantation immunology to tumor immune escape. *Inmunología.* 2006;25:25-38.

- 95.** Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA. Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics*. 1999;49(7-8):605-12.
- 96.** Lucas D, Campillo JA, Lopez-Hernandez R, Martinez-Garcia P, Lopez-Sanchez M, Botella C, et al. Allelic diversity of MICA gene and MICA/HLA-B haplotypic variation in a population of the Murcia region in southeastern Spain. *Hum Immunol*. 2008;69(10):655-60.
- 97.** Zhang Y, Lazaro AM, Lavingia B, Stastny P. Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum Immunol*. 2001;62(6):620-31.
- 98.** Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:413-41.
- 99.** Li P, Willie ST, Bauer S, Morris DL, Spies T, Strong RK. Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity*. 1999;10(5):577-84.
- 100.** Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol*. 2001;2(5):443-51.
- 101.** Gonzalez S, Groh V, Spies T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;298:121-38.
- 102.** Groh V, Smythe K, Dai Z, Spies T. Fas-ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity. *Nat Immunol*. 2006;7(7):755-62.
- 103.** Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol*. 2001;2(3):255-60.

- 104.** Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol.* 2001;22(7):378-85.
- 105.** Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, et al. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics.* 2001;53(4):279-87.
- 106.** Tonnerre P, Gerard N, Chatelais M, Poli C, Allard S, Cury S, et al. MICA variant promotes allosensitization after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(6):954-66.
- 107.** Møllergaard M, Skovbakke SL, Schneider CL, Lauridsen F, Andresen L, Jensen H, et al. N-glycosylation of asparagine 8 regulates surface expression of major histocompatibility complex class I chain-related protein A (MICA) alleles dependent on threonine 24. *J Biol Chem.* 2014;289(29):20078-91.
- 108.** Zou Y, Stastny P. The role of major histocompatibility complex class I chain-related gene A antibodies in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2009;14(4):414-8.
- 109.** Schrambach S, Ardizzone M, Leymarie V, Sibilio J, Bahram S. In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS One.* 2007;2(6):e518.
- 110.** Zwirner NW, Dole K, Stastny P. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum Immunol.* 1999;60(4):323-30.
- 111.** Zou Y, Bresnahan W, Taylor RT, Stastny P. Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. *J Immunol.* 2005;174(5):3098-104.

- 112.** Caillat-Zucman S. How NKG2D ligands trigger autoimmunity? *Hum Immunol.* 2006;67(3):204-7.
- 113.** Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(12):6879-84.
- 114.** Molinero LL, Fuertes MB, Rabinovich GA, Fainboim L, Zwirner NW. Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28. *J Leukoc Biol.* 2002;71(5):791-7.
- 115.** Eagle RA, Jafferji I, Barrow AD. Beyond Stressed Self: Evidence for NKG2D Ligand Expression on Healthy Cells. *Curr Immunol Rev.* 2009;5(1):22-34.
- 116.** Choy MK, Phipps ME. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol Med.* 2010;16(3):97-106.
- 117.** Ashiru O, Boutet P, Fernandez-Messina L, Aguera-Gonzalez S, Skepper JN, Vales-Gomez M, et al. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res.* 2010;70(2):481-9.
- 118.** Chauveau A, Tonnerre P, Pabois A, Gavlovsky PJ, Chatelais M, Coupel S, et al. Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding. *J Innate Immun.* 2014;6(1):89-104.
- 119.** Hankey KG, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Klassen DK, Philosophe B, Bartlett ST, et al. MIC expression in renal and pancreatic allografts. *Transplantation.* 2002;73(2):304-6.

- 120.** Wei L, Lu J, Feng L, Li S, Long D, Shan J, et al. Ischemia/Reperfusion Injury Promotes MICA and MICB Expression on Human Cardiac Myocytes Via HIF-1 Pathway. *Am J Transplant.* 2009;Supplement 9:576-7.
- 121.** Luo L, Lu J, Wei L, Long D, Guo JY, Shan J, et al. The role of HIF-1 in up-regulating MICA expression on human renal proximal tubular epithelial cells during hypoxia/reoxygenation. *BMC Cell Biol.* 2010;11:91.
- 122.** Zou Y, Heinemann FM, Grosse-Wilde H, Sireci G, Wang Z, Lavingia B, et al. Detection of anti-MICA antibodies in patients awaiting kidney transplantation, during the post-transplant course, and in eluates from rejected kidney allografts by Luminex flow cytometry. *Hum Immunol.* 2006;67(3):230-7.
- 123.** Solgi G, Furst D, Mytilineos J, Pourmand G, Amirzargar AA. Clinical relevance of pre and post-transplant immune markers in kidney allograft recipients: anti-HLA and MICA antibodies and serum levels of sCD30 and sMICA. *Transpl Immunol.* 2012;26(2-3):81-7.
- 124.** Lemy A, Andrien M, Wissing KM, Ryhahi K, Vandersarren A, Racape J, et al. Major histocompatibility complex class 1 chain-related antigen a antibodies: sensitizing events and impact on renal graft outcomes. *Transplantation.* 2010;90(2):168-74.
- 125.** Mizutani K, Terasaki P, Bignon JD, Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Shih RN, et al. Association of kidney transplant failure and antibodies against MICA. *Hum Immunol.* 2006;67(9):683-91.
- 126.** Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival. *Am J Transplant.* 2007;7(2):408-15.

- 127.** Panigrahi A, Gupta N, Siddiqui JA, Margoob A, Bhowmik D, Guleria S, et al. Post transplant development of MICA and anti-HLA antibodies is associated with acute rejection episodes and renal allograft loss. *Hum Immunol.* 2007;68(5):362-7.
- 128.** Stastny P. Introduction: MICA/MICB in innate immunity, adaptive immunity, autoimmunity, cancer, and in the immune response to transplants. *Hum Immunol.* 2006;67(3):141-4.
- 129.** Duquesnoy RJ, Mosteck J, Hariharan J, Balazs I. Structurally based epitope analysis of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) antibody specificity patterns. *Hum Immunol.* 2008;69(12):826-32.
- 130.** Zou Y, Qin Z, Silveus A, Fan Y, Stastny P. Polymorphisms of MICA recognized by human alloantibodies. *Immunogenetics.* 2009;61(2):91-100.
- 131.** Suarez-Alvarez B, Alonso-Arias R, Bravo-Mendoza C, Lopez-Vazquez A, Ortega T, Baltar JM, et al. Identification of epitopes and immunodominant regions on the MICA protein defined by alloantibodies from kidney transplant patients. *Transplantation.* 2009;88(3 Suppl):S68-77.
- 132.** Cox ST, Stephens HA, Fernando R, Karasu A, Harber M, Howie AJ, et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A allele mismatching, antibodies, and rejection in renal transplantation. *Hum Immunol.* 2011;72(10):827-34.
- 133.** Mizutani K, Terasaki P, Rosen A, Esquenazi V, Miller J, Shih RN, et al. Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *Am J Transplant.* 2005;5(9):2265-72.
- 134.** Mizutani K, Shibata L, Ozawa M, Esquenazi V, Rosen A, Miller J, et al. Detection of HLA and MICA antibodies before kidney graft failure. *Clin Transpl.* 2006:255-64.

- 135.** Lemy A, Andrien M, Lionet A, Labalette M, Noel C, Hiesse C, et al. Posttransplant major histocompatibility complex class I chain-related gene A antibodies and long-term graft outcomes in a multicenter cohort of 779 kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2012;93(12):1258-64.
- 136.** Amico P, Honger G, Biemann D, Lutz D, Garzoni D, Steiger J, et al. Incidence and prediction of early antibody-mediated rejection due to non-human leukocyte antigen-antibodies. *Transplantation*. 2008;85(11):1557-63.
- 137.** Amezaga N, Crespo M, Lopez-Cobos M, Millan MA, Vinas O, Sole M, et al. Relevance of MICA antibodies in acute humoral rejection in renal transplant patients. *Transpl Immunol*. 2006;17(1):39-42.
- 138.** Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999;285(5428):727-9.
- 139.** Alessandri C, Bombardieri M, Valesini G. Pathogenic mechanisms of anti-endothelial cell antibodies (AECA): their prevalence and clinical relevance. *Adv Clin Chem*. 2006;42:297-326.
- 140.** Filippone EJ, Farber JL. Humoral Immune Response and Allograft Function in Kidney Transplantation. *Am J Kidney Dis*. 2015.
- 141.** Regent A, Lofek S, Dib H, Bussone G, Tamas N, Federici C, et al. Identification of target antigens of anti-endothelial cell antibodies in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitides: a proteomic approach. *Clin Immunol*. 2014;153(1):123-35.

- 142.** Karasawa R, Yudoh K, Ozaki S, Kato T. Anti-endothelial cell antibodies (AECA) in patients with systemic vasculitis: our research using proteomics. *Expert Opin Biol Ther.* 2011;11(1):77-87.
- 143.** Praprotnik S, Blank M, Meroni PL, Rozman B, Eldor A, Shoenfeld Y. Classification of anti-endothelial cell antibodies into antibodies against microvascular and macrovascular endothelial cells: the pathogenic and diagnostic implications. *Arthritis Rheum.* 2001;44(7):1484-94.
- 144.** Dragun D, Philippe A, Catar R. Role of non-HLA antibodies in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2012;17(4):440-5.
- 145.** Jackson AM, Sigdel TK, Delville M, Hsieh SC, Dai H, Bagnasco S, et al. Endothelial cell antibodies associated with novel targets and increased rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(5):1161-71.
- 146.** Hourmant M, Buzelin F, Dantal J, van Dixhoorn M, Le Forestier M, Coste M, et al. Late acute failure of well-HLA-matched renal allografts with capillary congestion and arteriolar thrombi. *Transplantation.* 1995;60(11):1252-60.
- 147.** Sumitran-Karuppan S, Tyden G, Reinholt F, Berg U, Moller E. Hyperacute rejections of two consecutive renal allografts and early loss of the third transplant caused by non-HLA antibodies specific for endothelial cells. *Transpl Immunol.* 1997;5(4):321-7.
- 148.** Grandtnerova B, Laca L, Jahnova E, Horvathova M, Balaz V, Hovorikova B, et al. Hyperacute rejection of living related kidney graft caused by IgG endothelial specific antibodies with a negative monocyte cross-match. *Ann Transplant.* 2002;7(4):52-4.

- 149.** Xavier P, Aires P, Sampaio S, Mendes C, Monteiro M, Alves H, et al. XM-ONE detection of endothelium cell antibodies identifies a subgroup of HLA-antibody negative patients undergoing acute rejection. *Transplant Proc.* 2011;43(1):91-4.
- 150.** Ronda C, Borba SC, Ferreira SC, Glotz D, Ianhez LE, Rodrigues H, et al. Non-human leukocyte antigen antibodies reactive with endothelial cells could be involved in early loss of renal allografts. *Transplant Proc.* 2011;43(4):1345-8.
- 151.** Grandtnerova B, Mackova N, Hovoricova B, Jahnova E. Hyperacute rejection of living related kidney grafts caused by endothelial cell-specific antibodies: case reports. *Transplant Proc.* 2008;40(7):2422-4.
- 152.** Jackson AM, Kuperman MB, Montgomery RA. Multiple hyperacute rejections in the absence of detectable complement activation in a patient with endothelial cell reactive antibody. *Am J Transplant.* 2012;12(6):1643-9.
- 153.** Ismail AM, Badawi RM, El-Agroudy AE, Mansour MA. Pretransplant detection of anti-endothelial cell antibodies could predict renal allograft outcome. *Exp Clin Transplant.* 2009;7(2):104-9.
- 154.** Nakagawa Y, Saito K, Morioka T, Tomita Y, Takahashi K, Oite T. The clinical significance of antibody to vascular endothelial cells after renal transplantation. *Clin Transplant.* 2002;16 Suppl 8:51-7.
- 155.** Han F, Lv R, Jin J, Wu J, Chen Y, Wang H, et al. Pre-transplant serum concentrations of anti-endothelial cell antibody in panel reactive antibody negative renal recipients and its impact on acute rejection. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(10):1265-9.

- 156.** Sun Q, Liu Z, Chen J, Chen H, Wen J, Cheng D, et al. Circulating anti-endothelial cell antibodies are associated with poor outcome in renal allograft recipients with acute rejection. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(5):1479-86.
- 157.** Piotti G, Palmisano A, Maggiore U, Buzio C. Vascular endothelium as a target of immune response in renal transplant rejection. *Front Immunol*. 2014;5:505.
- 158.** Win TS, Pettigrew GJ. Humoral autoimmunity and transplant vasculopathy: when allo is not enough. *Transplantation*. 2010;90(2):113-20.
- 159.** Zhang Q, Reed EF. Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(5):682-8.
- 160.** Focosi D, Ricchiuti G, Biagini C, De Donno M, Funel N, Marchitti P, et al. Clinical Impact of Anti-Endothelial Cell Antibodies in Kidney and Pancreas Transplantation. *Enliven Archive*. 2014;1(1):1-7.
- 161.** Hosenpud JD, Everett JP, Morris TE, Mauck KA, Shipley GD, Wagner CR. Cardiac allograft vasculopathy. Association with cell-mediated but not humoral alloimmunity to donor-specific vascular endothelium. *Circulation*. 1995;92(2):205-11.
- 162.** Delville M, Charreau B, Rabant M, Legendre C, Anglicheau D. Pathogenesis of non-HLA antibodies in solid organ transplantation: Where do we stand? *Hum Immunol*. 2016.
- 163.** Drucker E, Krapfenbauer K. Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive and personalised medicine. *EPMA J*. 2013;4(1):7.
- 164.** Tait BD, Susal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*. 2013;95(1):19-47.

- 165.** Otten HG, Verhaar MC, Borst HP, Hene RJ, van Zuilen AD. Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. *Am J Transplant.* 2012;12(6):1618-23.
- 166.** Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med.* 1969;280(14):735-9.
- 167.** Lufft V, Kliem V, Tusch G, Dannenberg B, Brunkhorst R. Renal transplantation in older adults: is graft survival affected by age? A case control study. *Transplantation.* 2000;69(5):790-4.
- 168.** Sicard A, Ducreux S, Rabeyrin M, Couzi L, McGregor B, Badet L, et al. Detection of C3d-binding donor-specific anti-HLA antibodies at diagnosis of humoral rejection predicts renal graft loss. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(2):457-67.
- 169.** Sutherland SM, Chen G, Sequeira FA, Lou CD, Alexander SR, Tyan DB. Complement-fixing donor-specific antibodies identified by a novel C1q assay are associated with allograft loss. *Pediatr Transplant.* 2012;16(1):12-7.
- 170.** Piazza A, Poggi E, Ozzella G, Adorno D. Post-transplant development of C1q-positive HLA antibodies and kidney graft survival. *Clin Transpl.* 2013:367-75.
- 171.** Loupy A, Lefaucheur C, Vernerey D, Prugger C, Duong van Huyen JP, Mooney N, et al. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N Engl J Med.* 2013;369(13):1215-26.
- 172.** Honger G, Wahrmann M, Amico P, Hopfer H, Bohmig GA, Schaub S. C4d-fixing capability of low-level donor-specific HLA antibodies is not predictive for early antibody-mediated rejection. *Transplantation.* 2010;89(12):1471-5.

- 173.** Crespo M, Torio A, Mas V, Redondo D, Perez-Saez MJ, Mir M, et al. Clinical relevance of pretransplant anti-HLA donor-specific antibodies: does C1q-fixation matter? *Transpl Immunol.* 2013;29(1-4):28-33.
- 174.** Zwirner NW, Fernandez-Vina MA, Stastny P. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics.* 1998;47(2):139-48.
- 175.** Zou Y, Mirbaha F, Lazaro A, Zhang Y, Lavingia B, Stastny P. MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies. *Hum Immunol.* 2002;63(1):30-9.
- 176.** Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Gonzalez MZ, Fdez-Morera JL, Diaz-Molina B, Blanco-Gelaz MA, et al. The relationship of anti-MICA antibodies and MICA expression with heart allograft rejection. *Am J Transplant.* 2007;7(7):1842-8.
- 177.** Lindqvist KJ, Osterland CK. Human antibodies to vascular endothelium. *Clin Exp Immunol.* 1971;9(6):753-60.
- 178.** Miura K, Aoun K, Yoshida S, Kurosawa Y. Autoantibodies directed against labile epitopes on cell surface proteins in autoimmune disease patients: proposal of a novel ELISA for the detection of anti-endothelial cell antibodies. *J Immunol Methods.* 2012;382(1-2):32-9.
- 179.** Vermehren D, Sumitran-Holgersson S. Isolation of precursor endothelial cells from peripheral blood for donor-specific crossmatching before organ transplantation. *Transplantation.* 2002;74(11):1479-86.
- 180.** Bach F, Hirschhorn K. Lymphocyte Interaction: A Potential Histocompatibility Test in Vitro. *Science.* 1964;143(3608):813-4.

- 181.** Bestard O, Cravedi P. Monitoring alloimmune response in kidney transplantation. *J Nephrol.* 2016.
- 182.** Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, Sebastian A, Wright HI, Sigle G, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay. *Transplantation.* 2006;82(5):663-8.
- 183.** Perez-Flores I, Sanchez-Fructuoso A, Santiago JL, Fernandez-Arquero M, Calvo N, de la Concha EG, et al. Intracellular ATP levels in CD4+ lymphocytes are a risk marker of rejection and infection in renal graft recipients. *Transplant Proc.* 2009;41(6):2106-8.
- 184.** Torio A, Fernandez EJ, Montes-Ares O, Guerra RM, Perez MA, Checa MD. Lack of association of immune cell function test with rejection in kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2011;43(6):2168-70.
- 185.** Huskey J, Gralla J, Wiseman AC. Single time point immune function assay (ImmuKnow) testing does not aid in the prediction of future opportunistic infections or acute rejection. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(2):423-9.
- 186.** Pelzl S, Opelz G, Wiesel M, Schnulle P, Schonemann C, Dohler B, et al. Soluble CD30 as a predictor of kidney graft outcome. *Transplantation.* 2002;73(1):3-6.
- 187.** Chen Y, Tai Q, Hong S, Kong Y, Shang Y, Liang W, et al. Pretransplantation soluble CD30 level as a predictor of acute rejection in kidney transplantation: a meta-analysis. *Transplantation.* 2012;94(9):911-8.
- 188.** Susal C, Opelz G. Posttransplant sCD30 as a biomarker to predict kidney graft outcome. *Clin Chim Acta.* 2012;413(17-18):1350-3.
- 189.** Hirt-Minkowski P, Roth M, Honger G, Amico P, Hopfer H, Schaub S. Soluble CD30 correlates with clinical but not subclinical renal allograft rejection. *Transpl Int.* 2013;26(1):75-83.

- 190.** Hricik DE, Rodriguez V, Riley J, Bryan K, Tary-Lehmann M, Greenspan N, et al. Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2003;3(7):878-84.
- 191.** Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S, Dejelo C, Hricik DE, Schulak JA, et al. Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol.* 1999;163(4):2267-75.
- 192.** Nather BJ, Nickel P, Bold G, Presber F, Schonemann C, Pratschke J, et al. Modified ELISPOT technique--highly significant inverse correlation of post-Tx donor-reactive IFN-gamma-producing cell frequencies with 6 and 12 months graft function in kidney transplant recipients. *Transpl Immunol.* 2006;16(3-4):232-7.
- 193.** Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant.* 2009;9(10):2312-23.
- 194.** Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(1):42-8.
- 195.** Sellares J, Reeve J, Loupy A, Mengel M, Sis B, Skene A, et al. Molecular diagnosis of antibody-mediated rejection in human kidney transplants. *Am J Transplant.* 2013;13(4):971-83.
- 196.** Sigdel TK, Sarwal MM. Cell-free DNA as a measure of transplant injury. *Clin Transpl.* 2012:201-5.

- 197.** Mincheva-Nilsson L, Nagaeva O, Chen T, Stendahl U, Antsiferova J, Mogren I, et al. Placenta-derived soluble MHC class I chain-related molecules down-regulate NKG2D receptor on peripheral blood mononuclear cells during human pregnancy: a possible novel immune escape mechanism for fetal survival. *J Immunol.* 2006;176(6):3585-92.
- 198.** Alvarez-Marquez A, Aguilera I, Blanco RM, Pascual D, Encarnacion-Carrizosa M, Alvarez-Lopez MR, et al. Positive association of anticytoskeletal endothelial cell antibodies and cardiac allograft rejection. *Hum Immunol.* 2008;69(3):143-8.
- 199.** Shin YS, Yang CW, Ahn HJ, Park CW, Jin DC, Kim YS, et al. Clinical significance of anti-endothelial cell antibody in renal transplant recipients. *Korean J Intern Med.* 2001;16(1):24-9.
- 200.** Hourmant M, Cesbron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Meurette A, et al. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(9):2804-12.
- 201.** Briggs D, Zehnder D, Higgins RM. Development of non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation: frequency and clinical implications. *Contrib Nephrol.* 2009;162:107-16.
- 202.** Gratwohl A, Dohler B, Stern M, Opelz G. H-Y as a minor histocompatibility antigen in kidney transplantation: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2008;372(9632):49-53.
- 203.** Reinsmoen NL, Lai CH, Heidecke H, Haas M, Cao K, Ong G, et al. Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA antibody negative patients. *Transplantation.* 2010;90(12):1473-7.

- 204.** Woywodt A, Schroeder M, Mengel M, Schwarz A, Gwinner W, Haller H, et al. Circulating endothelial cells are a novel marker of cyclosporine-induced endothelial damage. *Hypertension*. 2003;41(3 Pt 2):720-3.
- 205.** Jurcevic S, Dunn MJ, Crisp S, Busing K, Rinaldi M, Pellegrini C, et al. A new enzyme-linked immunosorbent assay to measure anti-endothelial antibodies after cardiac transplantation demonstrates greater inhibition of antibody formation by tacrolimus compared with cyclosporine. *Transplantation*. 1998;65(9):1197-202.
- 206.** Heaphy EL, Poggio ED, Flechner SM, Goldfarb DA, Askar M, Fatica R, et al. Risk factors for retransplant kidney recipients: relisting and outcomes from patients' primary transplant. *Am J Transplant*. 2014;14(6):1356-67.
- 207.** Gebel HM, Liwski RS, Bray RA. Technical aspects of HLA antibody testing. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013;18(4):455-62.
- 208.** Duquesnoy RJ, Mosteck J, Marrari M, da Silva AS, da Mata Sousa LC, do Monte SJ. First report on the antibody verification of MICA epitopes recorded in the HLA epitope registry. *Int J Immunogenet*. 2014;41(5):370-7.
- 209.** Seiler M, Brabcova I, Viklicky O, Hribova P, Rosenberger C, Pratschke J, et al. Heightened expression of the cytotoxicity receptor NKG2D correlates with acute and chronic nephropathy after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2007;7(2):423-33.
- 210.** Ihn H, Sato S, Fujimoto M, Igarashi A, Yazawa N, Kubo M, et al. Characterization of autoantibodies to endothelial cells in systemic sclerosis (SSc): association with pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol*. 2000;119(1):203-9.
- 211.** Alard JE, Hillion S, Guillevin L, Saraux A, Pers JO, Youinou P, et al. Autoantibodies to endothelial cell surface ATP synthase, the endogenous receptor for hsp60, might play a pathogenic role in vasculatides. *PLoS One*. 2011;6(2):e14654.

- 212.** Carter V, Howell WM. Vimentin antibody production in transplant patients and immunomodulatory effects of vimentin in-vitro. *Hum Immunol.* 2013;74(11):1463-9.
- 213.** Acevedo MJ, Caro-Oleas JL, Alvarez-Marquez AJ, Sobrino JM, Lage-Galle E, Aguilera I, et al. Antibodies against heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in patients with cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(9):1051-9.
- 214.** Qin Z, Lavingia B, Zou Y, Stastny P. Antibodies against nucleolin in recipients of organ transplants. *Transplantation.* 2011;92(7):829-35.
- 215.** Tinckam KJ, Heeger PS. Transplantation: Complementing donor-specific antibody testing. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(12):713-4.
- 216.** Puttarajappa C, Shapiro R, Tan HP. Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. *J Transplant.* 2012;2012:193724.
- 217.** Peng Y, Martin DA, Kenkel J, Zhang K, Ogden CA, Elkon KB. Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J Autoimmun.* 2007;29(4):303-9.
- 218.** Gao B, Moore C, Porcheray F, Rong C, Abidoglu C, DeVito J, et al. Pretransplant IgG reactivity to apoptotic cells correlates with late kidney allograft loss. *Am J Transplant.* 2014;14(7):1581-91.
- 219.** Porcheray F, Fraser JW, Gao B, McColl A, DeVito J, Dargon I, et al. Polyreactive antibodies developing amidst humoral rejection of human kidney grafts bind apoptotic cells and activate complement. *Am J Transplant.* 2013;13(10):2590-600.
- 220.** Saini D, Weber J, Ramachandran S, Phelan D, Tiriveedhi V, Liu M, et al. Alloimmunity-induced autoimmunity as a potential mechanism in the pathogenesis of chronic rejection of human lung allografts. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(6):624-31.

- 221.** Seetharam A, Tiriveedhi V, Mohanakumar T. Alloimmunity and autoimmunity in chronic rejection. Curr Opin Organ Transplant. 2010;15(4):531-6.

VII. ANEXOS



Informe de Idoneidad del Formato de Tesis por Publicaciones

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	ELENA SÁNCHEZ ZAPARDIEL
Título de la Tesis	SIGNIFICADO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-MICA Y ANTI-ENDOTELIALES EN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE RENAL
Facultad o Centro	FACULTAD DE MEDICINA UCM

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	ESTELA PAZ ARTAL
Centro al que pertenece en la actualidad	HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE
D.N.I./Pasaporte	25131880X
e-mail	estela.paz@salud.madrid.org

DATOS DEL TUTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	M^a JOSÉ RECIO HOYAS
Centro al que pertenece en la actualidad	UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
D.N.I./Pasaporte	50622897N
e-mail	majoreho@med.ucm.es

INFORME:

La directora y la tutora de la presente Tesis Doctoral hacemos constar la idoneidad de la presentación de esta Tesis bajo la modalidad de compendio de las publicaciones. Los artículos que forman parte se indican en el cuadro adjunto, especificando la contribución del doctorando y el índice de calidad de la revista en el momento de su publicación.

Publicaciones	Contribución del doctorando	Índice de calidad (área y posición de la revista en esa área [Q], factor de impacto [FI])
Harmful effect of preformed anti-MICA antibodies on renal allograft evolution in early post-transplantation period. Sánchez-Zapardiel, E., Castro-Panete, M.J., Castillo-Rama, M., Morales, P., Lora-Pablos, D., Valero-Hervás, D., Ruiz-García, R., Talise, M., Apaza, J., Amado, A., Morales, J.M., Paz-Artal, E., Transplantation. 2013, 96(1):70-8, 2013, July 15.	Participación en: <ul style="list-style-type: none"> - Diseño del estudio - Ejecución de los experimentos - Análisis de los datos - Escritura del artículo 	Posición según área: Cirugía Q1 Inmunología Q2 Trasplante Q2 FI: 3.535
Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement dependent cytotoxicity. Elena Sánchez-Zapardiel, María José Castro-Panete, Esther Mancebo, Pablo Morales, Rocío Laguna-Goya, José María Morales, Jacqueline Apaza, Amado de Andrés, Paloma Talayero, Estela Paz-Artal Nephrology Dialysis transplantation, Nephrol Dial Transplant. 2016, Jan;31(1):150-60. doi: 10.1093/ndt/gfv308. Epub 2015 Aug 30.	Participación en: <ul style="list-style-type: none"> - Diseño del estudio - Ejecución de los experimentos - Análisis de los datos - Escritura del artículo 	Posición según área: Trasplante Q1 Urología y Nefrología Q1 FI: 3.577
Isolated de novo anti-endothelial cell antibodies and kidney transplant rejection. Elena Sánchez-Zapardiel, Esther Mancebo, María Díaz-Ordoñez, Lucía Jorge-Huertas, Lara Ruiz-Martínez, Antonio Serrano, María J. Castro-Panete, Pablo Morales, Amado Andrés, José M. Morales, Sara Domínguez-Rodríguez, Estela Paz-Artal. Am J Kidney Dis. 2016, Sep 3. pii: S0272-6386(16)30351-1. doi: 10.1053/j.ajkd.2016.07.019. [Epub ahead of print].	Participación en: <ul style="list-style-type: none"> - Diseño del estudio - Ejecución de los experimentos - Análisis de los datos - Escritura del artículo 	Posición según área: Urología y Nefrología Q1 FI: 6.269

Madrid, a 22 Septiembre de 2016

Fdo.:



Estela Paz Artal



Mª José Recio Hoyas

Este impreso deberá entregarse a la Comisión Académica responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral, con el fin de que se incluya junto con la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la aprobación, si procede, y designación del Tribunal que ha de juzgar la Tesis Doctoral en el acto de defensa.



RightsLink®

[Home](#)[Create Account](#)[Help](#)

Title: Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period

Author: Elena Sánchez-Zapardiel, María Castro-Panete, Marcela Castillo-Rama, et al

Publication: Transplantation

Publisher: Wolters Kluwer Health, Inc.

Date: Jan 1, 2013

Copyright © 2013, (C) 2013 by Lippincott Williams

[LOGIN](#)

If you're a **copyright.com** user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a **RightsLink** user or want to [learn more?](#)

This reuse is free of charge. No permission letter is needed from Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wilkins. We require that all authors always include a full acknowledgement. Example: AIDS: 13 November 2013 - Volume 27 - Issue 17 - p 2679-2689. Wolters Kluwer Health Lippincott Williams & Wilkins© No modifications will be permitted.

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)

Copyright © 2016 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement.](#) [Terms and Conditions.](#)

Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 21, 2016

This Agreement between Elena Sánchez Zapardiel ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number	3860671330595
License date	May 02, 2016
Licensed Content Publisher	Oxford University Press
Licensed Content Publication	Nephrology Dialysis Transplantation
Licensed Content Title	Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity:
Licensed Content Author	Elena Sánchez-Zapardiel, María José Castro-Panete, Esther Mancebo, Pablo Morales, Rocío Laguna-Goya, José María Morales, Jacqueline Apaza, Amado de Andrés, Paloma Talayero, Estela Paz-Artal
Licensed Content Date	01/01/2016
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	SIGNIFICADO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-MICA Y ANTI-ENDOTELIALES EN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE RENAL
Publisher of your work	n/a
Expected publication date	Oct 2016
Permissions cost	0.00 EUR
Value added tax	0.00 EUR
Total	0.00 EUR
Requestor Location	Elena Sánchez Zapardiel C/Pradolongo, 1 5D Madrid, 28041 Spain Attn: Elena Sánchez Zapardiel
Billing Type	Invoice
Billing Address	Elena Sánchez Zapardiel C/Pradolongo, 1 5D Madrid, Spain 28041 Attn: Elena Sánchez Zapardiel
Total	0.00 EUR
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.

4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.
6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oup.com
7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.
8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.
10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employs and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
12. Other Terms and Conditions:
v1.4

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 21, 2016

This Agreement between Elena Sánchez Zapardiel ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number	3860680105228
License date	May 02, 2016
Licensed Content Publisher	Oxford University Press
Licensed Content Publication	Nephrology Dialysis Transplantation
Licensed Content Title	Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity:
Licensed Content Author	Elena Sánchez-Zapardiel, María José Castro-Panete, Esther Mancebo, Pablo Morales, Rocío Laguna-Goya, José María Morales, Jacqueline Apaza, Amado de Andrés, Paloma Talayero, Estela Paz-Artal
Licensed Content Date	01/01/2016
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	SIGNIFICADO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-MICA Y ANTI-ENDOTELIALES EN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE RENAL
Publisher of your work	n/a
Expected publication date	Oct 2016
Permissions cost	0.00 EUR
Value added tax	0.00 EUR
Total	0.00 EUR
Requestor Location	Elena Sánchez Zapardiel C/Pradolongo, 1 5D Madrid, 28041 Spain Attn: Elena Sánchez Zapardiel
Billing Type	Invoice
Billing Address	Elena Sánchez Zapardiel C/Pradolongo, 1 5D Madrid, Spain 28041 Attn: Elena Sánchez Zapardiel
Total	0.00 EUR
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.

4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.
6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oup.com
7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.
8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.
10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employs and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
12. Other Terms and Conditions:
v1.4

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 21, 2016

This Agreement between Elena Sánchez Zapardiel ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number	3860671459494
License date	May 02, 2016
Licensed Content Publisher	Oxford University Press
Licensed Content Publication	Nephrology Dialysis Transplantation
Licensed Content Title	Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity:
Licensed Content Author	Elena Sánchez-Zapardiel, María José Castro-Panete, Esther Mancebo, Pablo Morales, Rocío Laguna-Goya, José María Morales, Jacqueline Apaza, Amado de Andrés, Paloma Talayero, Estela Paz-Artal
Licensed Content Date	01/01/2016
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	SIGNIFICADO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-MICA Y ANTI-ENDOTELIALES EN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE RENAL
Publisher of your work	n/a
Expected publication date	Oct 2016
Permissions cost	0.00 EUR
Value added tax	0.00 EUR
Total	0.00 EUR
Requestor Location	Elena Sánchez Zapardiel C/Pradolongo, 1 5D Madrid, 28041 Spain Attn: Elena Sánchez Zapardiel
Billing Type	Invoice
Billing Address	Elena Sánchez Zapardiel C/Pradolongo, 1 5D Madrid, Spain 28041 Attn: Elena Sánchez Zapardiel
Total	0.00 EUR
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.

4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.
6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oup.com
7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.
8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.
10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employs and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
12. Other Terms and Conditions:
v1.4

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.



RightsLink®

[Account Info](#)
[Help](#)


Title: Isolated De Novo Antiendothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection

Author: Elena Sánchez-Zapardiel, Esther Mancebo, María Díaz-Ordoñez, Lucía de Jorge-Huerta, Lara Ruiz-Martínez, Antonio Serrano, María J. Castro-Panete, Alberto Utrero-Rico, Amado de Andrés, José M. Morales, Sara Domínguez-Rodríguez, Estela Paz-Artal

Publication: American Journal of Kidney Diseases

Publisher: Elsevier

Date: Dec 31, 1969

Copyright © 1969, Elsevier

Logged in as:

Elena Sánchez Zapardiel

Account #:
3001024626

[LOGOUT](#)

Review Order

Please review the order details and the associated [terms and conditions](#).

Last Comment: Permission is not required from Elsevier in future to reuse author's own work in thesis/dissertation

No royalties will be charged for this reuse request although you are required to obtain a license and comply with the license terms and conditions. To obtain the license, click the Accept button below.

Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	American Journal of Kidney Diseases
Licensed Content Title	Isolated De Novo Antiendothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection
Licensed Content Author	Elena Sánchez-Zapardiel, Esther Mancebo, María Díaz-Ordoñez, Lucía de Jorge-Huerta, Lara Ruiz-Martínez, Antonio Serrano, María J. Castro-Panete, Alberto Utrero-Rico, Amado de Andrés, José M. Morales, Sara Domínguez-Rodríguez, Estela Paz-Artal
Licensed Content Date	Available online 3 September 2016
Licensed Content Volume	n/a
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	1
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	SIGNIFICADO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-MICA Y ANTI-ENDOTELIALES EN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE RENAL
Expected completion date	Oct 2016
Estimated size (number of pages)	200
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Elena Sánchez Zapardiel C/Pradolongo, 1 5D Madrid, 28041 Spain

Attn: Elena Sánchez Zapardiel

Total

0.00 EUR

☒ I agree to these [terms and conditions](#).☒ I understand this license is for reuse only and that no content is provided.

Customer Code (if supplied)

APPLY**DECLINE****ACCEPT**

Copyright © 2016 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).

Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Doña Jacqueline Apaza Chávez

con Pasaporte N° 7096562

Teléfono 00511-952393696 e-mail jackie7sanfer_pex@hotmail.com

MANIFIESTO QUE:

Como coautora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Titulo: *Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period*

Año: 2013

Revista: Transplantation

Volumen: 96(1), págs. 70-78

Titulo: *Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity*

Año: 2016

Revista: Nephrology Dialysis Transplantation

Volumen: 31(1), págs. 150-160

Madrid a 19 de Agosto de 2016.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Jacqueline Apaza', with a large loop on the left and a horizontal line across the middle.

Firmado (firma original)

Doña Marcela Castillo Rama

con NIF 50319936F

Teléfono 914017622 e-mail mcastillorama@yahoo.es

MANIFIESTO QUE:

Como coautora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora.

Relación de artículos:

Titulo: *Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period*

Año: 2013

Revista: Transplantation

Volumen: 96(1), págs. 70-78

Madrid a 14 de Septiembre de 2016.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'MC. R.', is centered on the page.

Firmado

Doña M^a José Castro Panete

con NIF: 76358614v

Teléfono: 659573103

e-mail: mariajose.castro@salud.madrid.org

MANIFIESTO QUE:

Como coautora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora.

Relación de artículos:

Título: *Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period*

Año: 2013

Revista: Transplantation

Volumen: 96(1), págs. 70-78

Título: *Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity*

Año: 2016

Revista: Nephrology Dialysis Transplantation

Volumen: 31(1), págs. 150-160

Título: *Isolated De Novo Anti-endothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection*

Año: 2016

Revista: American Journal of Kidney Diseases

Aceptado para publicación: YAJKD_55937

Madrid a 18 de Agosto de 2016.



Firmado: M^a José Castro Panete

Don Amado de Andrés Belmonte

NIF 74172580H

Teléfono 609781693

e-mail amado.andres@salud.madrid.org

MANIFIESTO QUE:

Como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado en Investigación Biomédica para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Relación de artículos:

Título: *Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period*

Año: 2013

Revista: Transplantation

Volumen: 96(1), págs. 70-78

Título: *Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity*

Año: 2016

Revista: Nephrology Dialysis Transplantation

Volumen: 31(1), págs. 150-160

Título: *Isolated De Novo Anti-endothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection*

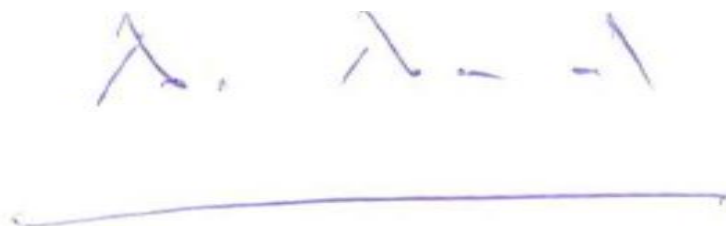
Año: 2016

Revista: American Journal of Kidney Diseases

Aceptado para publicación: YAJKD_55937

Madrid a 6 de septiembre de 2016.

Firmado



Doña Lucía de Jorge Huerta

con NIF: 47295121Z

Teléfono: 684054289

e-mail: luciajorgehuerta@hotmail.com

MANIFIESTO QUE:

Como coautora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

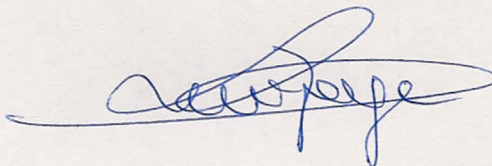
Título: *Isolated De Novo Anti-endothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection*

Año: 2016

Revista: American Journal of Kidney Diseases

Aceptado para publicación: YAJKD_55937

Madrid a 1 de Septiembre de 2016.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Lucía de Jorge Huerta', with a long horizontal stroke extending to the left.

Firmado

Doña María Díaz Ordóñez

con NIF 50556802L

Teléfono 678222010 e-mail mariadiaz.or@gmail.com

MANIFIESTO QUE:

Como coautora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *Isolated De Novo Anti-endothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection*

Año: 2016

Revista: American Journal of Kidney Diseases

Aceptado para publicación: YAJKD_55937

Madrid a 20 de Septiembre de 2016.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'M' followed by a horizontal line.

Firmado

Doña Sara Domínguez Domínguez Rodríguez

con NIF 46893534F

Teléfono 661810882 e-mail sara.dominguez.r@gmail.com

MANIFIESTO QUE:

Como coautora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

- Título: *Isolated De Novo Anti-endothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection*
Año: 2016
Revista: American Journal of Kidney Diseases
Aceptado para publicación: YAJKD_55937

Madrid a 18 de Agosto de 2016.

Firmado

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Sara Domínguez', with a stylized flourish at the end.

Doña Rocío Laguna Goya

con NIF 74665583Q

Teléfono 657161295 e-mail rociolagunagoya@gmail.com

MANIFIESTO QUE:

Como coautora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora.

Relación de artículos:

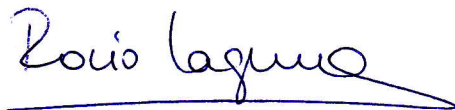
Título: *Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity*

Año: 2016

Revista: Nephrology Dialysis Transplantation

Volumen: 31(1), págs. 150-160

Madrid a 18 de Agosto de 2016.

A handwritten signature in blue ink, reading 'Rocío Laguna', with a horizontal line underneath.

Firmado

Don David Lora Pablos

con NIF 02249041D

Teléfono 917792637 e-mail david@h12o.es

MANIFIESTO QUE:

Como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Relación de artículos:

Título: *Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period*

Año: 2013

Revista: Transplantation

Volumen: 96(1), págs. 70-78

Madrid a 18 de Agosto de 2016.

Firmado



Doña Esther Mancebo Sierra

con NIF 70801228Y

Teléfono 636005752 e-mail esther.mancebo@salud.madrid.org

MANIFIESTO QUE:

Como coautora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora.

Relación de artículos:

Título: *Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity*

Año: 2016

Revista: Nephrology Dialysis Transplantation

Volumen: 31(1), págs. 150-160

Título: *Isolated De Novo Anti-endothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection*

Año: 2016

Revista: American Journal of Kidney Diseases

Aceptado para publicación: YAJKD_55937

Madrid a 18 de Agosto de 2016.



Firmado

Don José María Morales Cerdán

con NIF 17832140X.....

Teléfono34-607469173..... e-mail jmorales@h12o.es

MANIFIESTO QUE:

Como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Relación de artículos:

Título: *Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period*

Año: 2013

Revista: Transplantation

Volumen: 96(1), págs. 70-78

Título: *Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity*

Año: 2016

Revista: Nephrology Dialysis Transplantation

Volumen: 31(1), págs. 150-160

Título: *Isolated De Novo Anti-endothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection*

Año: 2016

Revista: American Journal of Kidney Diseases

Aceptado para publicación: YAJKD_55937

Madrid a .31..... deAgosto..... de 2016.



Jose Maria Morales Cerdan

Firmado (firma original)

Don Pablo Morales Pérez

con NIF: 28683382J

Teléfonos: 91 473 70 63 / 663 49 60 12, y e-mail: pmorales@h12o.es

MANIFIESTO QUE:

Como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Relación de artículos:

Título: *Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period*

Año: 2013

Revista: Transplantation

Volumen: 96(1), págs. 70-78


Título: *Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity*

Año: 2016

Revista: Nephrology Dialysis Transplantation

Volumen: 31(1), págs. 150-160

Madrid, a 19 de agosto de 2016.



Firmado: P. Morales

Doña Estela Paz Artal

con NIF 25131880X

Teléfono 649688788, e-mail estela.paz@salud.madrid.org

MANIFIESTO QUE:

Como coautora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora.

Relación de artículos:

Título: *Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period*

Año: 2013

Revista: Transplantation

Volumen: 96(1), págs. 70-78

Título: *Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity*

Año: 2016

Revista: Nephrology Dialysis Transplantation

Volumen: 31(1), págs. 150-160

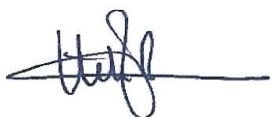
Título: *Isolated De Novo Anti-endothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection*

Año: 2016

Revista: American Journal of Kidney Diseases

Aceptado para publicación: YAJKD_55937

Madrid a 12 de septiembre de 2016.



Firmado (firma original): Estela Paz Artal

Doña Raquel Ruiz García

con NIF: 72095202T

Teléfono: 669077792 e-mail: rruizg@salud.madrid.org

MANIFIESTO QUE:

Como coautora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period*

Año: 2013

Revista: Transplantation

Volumen: 96(1), págs. 70-78

Madrid a 24 de Agosto de 2016.



Firmado: Raquel Ruiz García

Doña Lara Ruiz Martínez

con NIF 53475905 P

Teléfono 679 128 128 e-mail lara90_lfht@hotmail.com

MANIFIESTO QUE:

Como coautora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *Isolated De Novo Anti-endothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection*

Año: 2016

Revista: American Journal of Kidney Diseases

Aceptado para publicación: YAJKD_55937

Madrid a 14 de Septiembre de 2016.



Firmado (firma original)

Don Antonio Serrano Hernández

con NIF 50028413D

Teléfono 652085293 e-mail aserrano@h12o.es

MANIFIESTO QUE:

Como coautor DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor.

Relación de artículos:

Título: *Isolated De Novo Anti-endothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection*

Año: 2016

Revista: American Journal of Kidney Diseases

Aceptado para publicación: YAJKD_55937

Madrid a 17 de agosto de 2016.



Firmado: Antonio Serrano

Doña Paloma Talayero Giménez de Azcárate

con NIF 51083005M

Teléfono 667433029

e-mail paloma.talayero@salud.madrid.org

MANIFIESTO QUE:

Como coautora NO DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period*

Año: 2013

Revista: Transplantation

Volumen: 96(1), págs. 70-78

Título: *Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity*

Año: 2016

Revista: Nephrology Dialysis Transplantation

Volumen: 31(1), págs. 150-160

Madrid a 22 de Agosto de 2016.



Firmado

Don Alberto Utrero Rico

con NIF: 80075501N

Telefono 661068573, e-mail alberto.utrero@hotmail.com

MANIFIESTO QUE:

Como coautor NO DOCTOR de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informado de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautor RENUNCIANDO a la presentación de los trabajos relacionados como parte de mi tesis doctoral.

Relación de artículos:

Título: *Isolated De Novo Anti-endothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection*

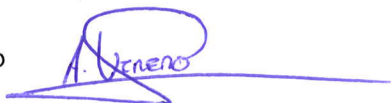
Año: 2016

Revista: American Journal of Kidney Diseases

Aceptado para publicación: YAJKD_55937

Madrid a 18 de agosto de 2016.

Firmado



Doña Diana Valero Hervás

con NIF. 44.520834-X

Teléfono 660551070 e-mail dianavalerohervas@gmail.com

MANIFIESTO QUE:

Como coautora DOCTORA de los artículos integrados en la tesis que presenta Doña **Elena Sánchez Zapardiel**, quedo informada de que tiene solicitada autorización de la Comisión Académica del Doctorado de Investigación Biomédica de la UCM para la presentación del ejemplar de su tesis en formato de compendio de publicaciones y, por lo tanto, autorizo la inclusión de los artículos de los que formo parte como coautora.

Relacion de artículos.

Título: *Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period*

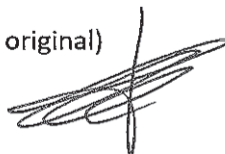
Año: 2013

Revista: Transplantation

Volumen: 96(1), págs. 70-78

Madrid a 19 de Agosto de 2016.

Firmado (firma original)

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke.